



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Análisis de los mecanismos implicados en el crecimiento y la muerte celular de *Drosophila* *melanogaster*

Carolina J. Simoes da Silva Pereira

Tesis Doctoral

MADRID

2017

Análisis de los mecanismos implicados en el crecimiento y la muerte celular de *Drosophila melanogaster*

Memoria presentada por Carolina J. Simoes da Silva Pereira para optar
al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

Carolina J. Simoes da Silva Pereira – Licenciada en Bioquímica

Directores de la Tesis:

Ana M. de Busturia Jimeno

Rocío Simón Sacristán

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

Tutor de la Tesis:

Prof. Ernesto Sánchez-Herrero

Madrid

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	5
RESUMEN EN CASTELLANO	7
INTRODUCCIÓN.....	9
1. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo	10
2. Morfogénesis de <i>Drosophila</i>	11
3. Control del tamaño de los órganos	13
3.1 Desarrollo del ala	14
3.2 Desarrollo del halterio	16
3.3 Regulación de la proliferación mediante el control del ciclo celular	18
3.4 Apoptosis y su regulación	20
4. Mecanismos de regulación de la expresión génica	23
4.1 Regulación de la expresión génica mediada por microRNAs.....	23
4.2 Regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción.....	25
4.3 Regulación de la expresión génica mediada por los factores epigenéticos de la familia Polycomb y trithorax.	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Estirpe de moscas empleadas	31
2. Obtención del cromosoma <i>Df(2R)exu¹,dRYBP/CyO</i> mediante recombinación	32
3. Generación de la construcción génica <i>p[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}</i> conteniendo la duplicación genómica de <i>miR-7</i>	32
4. Obtención de moscas transgénicas	33
5. Sistema Gal4/UAS	33
6. Medios de cultivo para las moscas.....	34
7. Inmunohistoquímica	35
7.1 Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia	35
7.2 Inmunohistoquímica para microscopía visible	36
8. Preparación histológica de alas y halterios	37
9. Citometría de flujo	37
10. Hibridación <i>in situ</i>	38
11. Inducción y análisis de los clones deficientes para <i>miR-7</i>	39
12. Medición del tamaño de las alas y validación del criterio de clasificación del tamaño	39
13. Medida de la densidad de tricomas y análisis de la intensidad de fluorescencia de los discos imaginales	40
14. Irradiación de larvas con rayos-X.....	40
15. Obtención y procesamiento de imágenes	40
16. Estudio de la letalidad durante el desarrollo	40
17. Análisis estadístico	41

RESULTADOS	43
1. Función de los microRNAs en la regulación génica que controla el crecimiento del ala de <i>Drosophila</i>	43
1.1 Análisis de la función del microRNA <i>miR-7</i> en el desarrollo del ala	43
1.2 Análisis de la función de <i>miR-306</i> en el desarrollo del ala	54
2. Función del factor de transcripción Abrupt en el desarrollo de ala y halterio	61
2.1 Abrupt se requiere funcionalmente para controlar el tamaño del ala y halterio	62
2.2 La inactivación de <i>abrupt</i> en el halterio afecta a su tamaño	65
2.3 Abrupt controla crecimiento a través del control del tamaño celular.	72
2.4 La modulación de los niveles de abrupt afecta la progresión del ciclo celular	73
2.5 Abrupt controla tamaño a través de sus dianas CycD-Cdk4, CycE-Cdk2	76
3. Función de las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) en el control de la apoptosis	80
3.1 Análisis de la función de la proteína dBre1 en la apoptosis	81
3.2 Análisis de la función de la proteína Sce en el control de la apoptosis	85
DISCUSIÓN	99
<i>miR-7</i> controla el crecimiento del ala	99
<i>miR-7</i> controla el crecimiento del ala a través de la vía de Notch, <i>dRYBP</i> y <i>dacapo</i>	100
<i>miR-306</i> controla el tamaño del ala	103
<i>miR-306</i> regula la expresión de <i>abrupt</i>	104
<i>abrupt</i> controla el tamaño del ala	104
<i>abrupt</i> controla el tamaño del halterio	105
La modulación de los niveles de Abrupt afecta la progresión del ciclo celular	107
La sobre-expresión de CycD-Cdk4 y CycE rescatan parcialmente los fenotipos asociados con la inactivación de <i>abrupt</i>	107
Regulación de la muerte celular mediada por los factores epigenéticos dBre1 y Sce	109
Los bajos niveles de Sce promueven apoptosis en el ala dependiente de los niveles de Dp53	110
Los altos niveles de Sce inhiben la apoptosis dependiente de Dp53 y para ello requiere a <i>dRYBP</i>	110
Los altos niveles de Sce inhibe la apoptosis asociada al crecimiento tumoral	112
CONCLUSIONS	115
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO 1	137
APÉNDICE 1	137
APÉNDICE 2	138
APÉNDICE 3	139
APÉNDICE 4	142
ANEXO 2	145

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Figura 2: Los genes homeóticos.....	12
Figura 3: Desarrollo del disco imaginal de ala.....	14
Figura 4: Formación de las venas en el disco imaginal y el ala.	16
Figura 5. La expresión de Ultrabithorax controla el tamaño del halterio.	17
Figura 6. El ciclo celular y su regulación.....	19
Figura 7: Ruta de activación de la apoptosis en <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Figura 8: Biogénesis de los microRNAs maduros.	24
Figura 9: La familia de las proteínas BTB-ZF.....	26
Figura 10: Mecanismos de acción de las proteínas PcG y trxG.....	28
Figura 11: Representación esquemática de los dominios de expresión dirigidos por las líneas Gal4 en los discos imaginales de ala de tercer estadio.....	31
Figura 12: El sistema Gal4/UAS.....	34
Tabla MM 1 : Lista de anticuerpos primarios y secundarios acoplados a fluoróforos.	36
Tabla MM 2: Tabla de anticuerpos secundarios biotinilados.	37
Figura 13: Localización genómica del microRNA <i>miR-7</i>	43
Figura 14: Detección de la sonda de <i>miR-7</i> mediante hibridación <i>in situ</i>	44
Figura 15: La modulación de los niveles de <i>miR-7</i> afecta la expresión de Cut y de Senseless.....	45
Figura 16: Análisis de la viabilidad de los individuos deficientes para <i>miR-7</i> a lo largo del desarrollo.	46
Figura 17: <i>miR-7</i> controla el tamaño del ala.....	48
Figura 18: Análisis del tamaño celular de discos y alas mutantes para <i>miR-7</i>	49
Figura 19: El sensor de <i>dacapo</i> responde a los altos niveles de <i>miR-7</i> en el disco de ala.....	51
Figura 20: Interacción genética entre <i>miR-7</i> y <i>Notch</i> , <i>cut</i> , <i>dacapo</i> y <i>dRYBP</i>	52
Figura 21: Validación estadística del criterio de clasificación del tamaño de las alas.	54
Figura 22: Localización genómica de <i>miR-306</i>	54
Figura 23: Representación esquemática del mecanismo de acción de las esponjas de microRNAs.	55

Figura 24: La falta de función de <i>miR-306</i> afecta el tamaño del ala.....	56
Figura 25: La sobre-expresión de <i>miR-306</i> afecta el desarrollo del ala.....	57
Figura 26: La sobre-expresión de <i>miR-306</i> induce apoptosis en el disco de ala.	59
Figura 27: El sensor de <i>abrupt</i> responde a altos niveles de <i>miR-306</i> en el disco de ala.....	60
Figura 28: <i>miR-306</i> regula la expresión de <i>Abrupt</i> en el disco de ala.	61
Figura 29: La falta de función de <i>abrupt</i> afecta el tamaño del ala y del halterio.....	63
Figura 30: Interacción genética entre <i>miR-306</i> y <i>abrupt</i>	65
Figura 31: Expresión de <i>ptc</i> -DsRed y <i>hh</i> -DsRed en el halterio de la mosca.....	66
Figura 32: Efecto de la falta de función de <i>abrupt</i> en la expresión de <i>ptc</i> -DsRed y <i>hh</i> -DsRed en los discos de ala y halterio.....	67
Figura 33: Efecto de la inactivación de <i>abrupt</i> en la expresión de <i>ptc</i> -DsRed y <i>hh</i> -DsRed en los halterios.....	68
Figura 34: Interacción genética entre <i>Ultrabithorax (Ubx)</i> y <i>abrupt (ab)</i> -I.....	69
Figura 35: Interacción genética entre <i>Ultrabithorax (Ubx)</i> y la falta de función de <i>abrupt (ab)</i> -II.	70
Figura 36: Fenotipos asociados con los altos niveles de <i>abrupt</i> en el ala y el halterio.....	72
Figura 37: Análisis de la densidad de tricomas en ausencia de <i>abrupt</i>	73
Figura 38: Efecto de la inactivación de <i>abrupt</i> en la progresión del ciclo celular....	74
Figura 39: Efecto de los altos niveles de <i>miR-306</i> en la progresión del ciclo celular.	76
Figura 40: Efecto de los altos niveles de <i>CycD-Cdk4</i> y de <i>CycE</i> en la reducción de tamaño del halterio producida por la inactivación de <i>abrupt</i>	78
Figura 41: La sobre-expresión de <i>CycD-Cdk4</i> , <i>CycE</i> y la inactivación de <i>dacapo</i> rescatan la reducción del tamaño del ala producido por la inactivación de <i>abrupt</i>	79
Figura 42: La sobre-expresión de <i>dMyc</i> no afecta la reducción del tamaño de las alas producido por la inactivación de <i>abrupt</i>	80
Figura 43: La inactivación de la función de <i>dBre1</i> promueve apoptosis dependiente de <i>Dp53</i>	82
Figura 44: Efecto de la falta de función de <i>dBre1</i> en la activación de <i>P53-RE-GFP</i>	83
Figura 45: La apoptosis debida a altos niveles de <i>dBre1</i> es independiente de <i>Dp53</i>	84
Figura 46: Efecto de la inactivación y de la sobre-expresión de <i>dRYBP</i> en la apoptosis inducida por la inactivación de <i>dBre1</i>	85

Figura 47: Bajos niveles de <i>Sce</i> promueven apoptosis dependiente de <i>Dp53</i>	87
Figura 48: Respuesta del reportero P53-RE-GFP a la modulación de los niveles de <i>Ubx</i> y a la inactivación de <i>Sce</i>	89
Figura 49: La sobre-expresión de <i>Sce</i> inhibe la apoptosis inducida por los altos niveles de <i>Dp53</i>	90
Figura 50: Efecto de la inactivación de <i>dRYBP</i> y de la sobre-expresión de <i>Sce</i> en la apoptosis inducida por altos niveles de <i>Dp53</i>	92
Figura 51: La apoptosis inducida por los altos niveles de <i>dRYBP</i> es dependiente de <i>Dp53</i>	93
Figura 52: Efecto de la sobre-expresión de <i>Sce</i> y <i>dRYBP</i> en la apoptosis inducida por altos niveles de <i>Dp53</i>	94
Figura 53: Efecto de la sobre-expresión de <i>Sce</i> en la apoptosis inducida por rayos-X.....	95
Figura 54: Efecto de la sobre-expresión de <i>Sce</i> en los sobre-crecimientos inducidos por la inactivación de <i>ph</i> y la sobre-expresión de <i>abrupt</i>	97
Figura 55: <i>miR-7</i> controla crecimiento a través de la regulación del ciclo celular: modelo	102
Figura 56: El eje <i>miR-306</i> - <i>abrupt</i> en el control del tamaño a través de la regulación de la progresión del ciclo: modelo	109
Figura 57: Mecanismo de acción de <i>Sce</i> en la regulación de la muerte celular dependiente de <i>Dp53</i> : modelo	112
Figura A1. 1: Análisis de los clones deficientes para <i>miR-7</i> en los discos imaginales de ala.....	137
Figura A2. 1: Efecto de la inactivación de la función de <i>Dp53</i> en los fenotipos asociados a la sobre-expresión de <i>miR-306</i>	138
Figura A3. 1: Efecto de la inactivación de la función de <i>Dp53</i> en los fenotipos de ala y halterio asociados a la inactivación de <i>abrupt</i>	139
Figura A3. 2: Efecto de la sobre-expresión de <i>abrupt</i> en la progresión del ciclo celular.....	140
Figura A3. 3: Fenotipo de sobre-expresión de <i>CycD-Cdk4</i> , <i>CycE</i> , <i>dMyc</i> y de la inactivación de la función de <i>dacapo</i>	141
Figura A4. 1: Respuesta del elemento P53-RE-GFP a la sobre-expresión de la isoforma truncada de <i>Dp53</i>	142
Figura A4. 2: Respuesta del elemento P53-RE-GFP a la inactivación de <i>bonus</i>	142
Figura A4. 3: Altos niveles de <i>Sce</i> inhiben la apoptosis inducida por la sobre-expresión de la isoforma truncada de <i>Dp53</i>	143

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

μl	microlitros
A/P	Antero-Posterior
aa	aminoácidos
ab	abrupt
ABC	Avidin-Biotin Complex
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ant-C	Antennapedia complex
ap	apterous
APC	Anaphase promotor complex
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNm	ARN mensajero
BCL6	B-Cell Lymphoma 6 codificada por ZBTB27
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
bl	bancal
Bre1	E3 ubiquitin- protein ligase Bre1
Brk	Brinker
BSA	Bovine Serum Albumin
BTB/POZ	Broad-complex, Tramtrack and Bric à brac/ Pox virus and zinc finger
Buffer AP	Buffer Alkaline Phosphatase
BX-C	Bithorax complex
C3	Caspasa-3 activada
Cdk1	Cyclin-dependent kinase-1
Cdk2	Cyclin-dependent kinase-2
Cdk4	Cyclin-dependent kinase-4
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation Sequencing
ci	cubitus interruptus
CKI	Cyclin Kinase Inhibitor
Ct	Cut
CycA	Ciclina A
CycB	Ciclina B
CycD	Ciclina D
CycE	Ciclina E
D/V	Dorso-Ventral
da	daughterless
DAB	DiAminoBencidina
dap	dacapo
Dcp-1	Death caspase-1
DEPC	DiEtil PiroCarbonato
Diap1	<i>Drosophila</i> inhibitor of apoptosis-1
dILP	<i>Drosophila</i> Insulin-Like Peptide

dMyc	<i>Drosophila myc</i>
DOC	ácido DeOxiCólico
DP	Dimerization Partner
DpΔ53	<i>Drosophila</i> p53 isoforma truncada
Dp53	<i>Drosophila</i> p53
Dpp	Decapentaplegic
drICE	<i>Drosophila</i> Interleukin 1beta-converting enzyme
Dronc	Death regulator Nedd2-like caspase
dRYBP	<i>Drosophila</i> Ring1b and YinYan1 binding protein
DsRed	<i>Dicosoma</i> sp. Red fluorescent protein
E[spl]-C	Enhancer of Split Complex
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EmPCNA	Emerald Proliferating cell nuclear antigen
en	engrailed
ETP	Enhancer of trithorax and Polycomb
EzH2	Enhancer of zeste Homolog 2
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fase G1 ó G2	Fase Gap 1 ó 2
Fase M	Fase Mitosis
Fase S	Fase Síntesis
FBS	Fetal Bovine Serum
Fly-Fucci	Fly-Fluorescent Ubiquitination-Based Cell Cycle Indicator
GFP	Green fluorescent protein
GH	Growth Factor
grp	grapes
GSCs	Germ Stem Cells
H	Horas
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B
HD	homeodominio
hh	hedgehog
HIC1	Hypermethylated in cancer-1 codificado por ZBTB29
Hid	Head involution defective
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IMD	Inmuno deficiency pathway
IRS	Insulin Receptor Substrate
KO	knock-out
I	litros
LNA	Locked Nucleic Acid
LRF/POKEMON	Leukemia-lymphoma Related Factor/ POZ and Krüppel Erythroid Myeloid ONtogenic factor cod ZBTB7A
MDM2	Mouse Double Minute 2

Me	metilación
min	minutos
miR-306	<i>microRNA-306</i>
miR-7	<i>microRNA-7</i>
miRNA	microRNA
ml	mililitros
mTOR	mammalian Target of Rampamycin
N	Notch
NBT/BCIP	Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indoly-Phosphate.
Omb	Optomotor-blind
P53-RE-GFP	P53 Response element GFP
pb	pares de bases
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBT	Phosphate-Buffered Saline + Tritón
PBTW	Phosphate-Buffered Saline + Tween20
PcG	Polycomb group
PFA	Paraformaldehido
ph	polyhomeotic
PH3	Phospho-Histone 3
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinase/ serine-treonine Kinase
PRC1 ó 2	Polycomb Repressive Complex 1 ó 2
PRE/TRE	Polycomb o Trithorax Response Element
PS	Parasegmento
Psc	Posterior Sex Combs
ptc	patched
Rbf	Retinoblastoma-family protein
RHG	Reaper Hid and Grim
RISC	miRNA-induced Silencing Complex
RNAi	ARN interferente
RNF2	Ring finger protein 2 (también conocido como Ring1B)
ROI	Region Of Interest
S2	Células Schneider 2 embrionarias de <i>Drosophila</i>
Sce	Sex comb extra
SCF	Skp1-Cullin-F-box complex
Scm	Sex comb on midleg
SCML2	Sex comb on midleg-like protein 2
sd	scalloped
Sens	Senseless
SH	Solución de hibridación
SkpA	S-Phase kinase-related protein
SNC	Sistema Nervioso Central
Sp	Esponja
TORC1	Transcriptional Coactivator for CREB1
TRBP	TAR binding protein
trxG	trithorax Group

U.A.	Unidades Arbitrarias
UAS	Upstream Activation Sequence
Ub	Ubiquitina
Ubx	Ultrabithorax
UTR	UntranslaTed Region
VDRC	Viena <i>Drosophila</i> Resource Center
Wg	Wingless
Wts/Sav	Warts/Salvador
Yaf2	YY1 associated factor-2
ZF	Zinc finger

SUMMARY

SUMMARY

Growth of tissues and organs requires the coordinated action of several processes such as cell growth, cell division, cell death and cell differentiation which in turn are regulated by the spatio-temporal expression of the genes therein involved. The convergence of external and internal *stimuli* triggers a response in the cells leading them to activate and/or repress a particular gene program that will orchestrate the correct development and size of the whole organism.

In this Thesis, the fly *Drosophila melanogaster* has been used as a model system to study the mechanisms involved in the control of growth and cell death. Within those mechanisms the function of the microRNAs *miR-7* and *miR-306*; the function of the *abrupt* gene, which encodes a transcription factor of the BTB-ZF family; and the function of the epigenetic factors dBre1, a member of the trithorax group and Sce (Sex comb extra) a member of the Polycomb group have been analyzed. The main conclusions from this Thesis are: 1) The expression of the microRNA *miR-7* is ubiquitously detected in wing imaginal disc cells, being the expression stronger in the “non-boundary cells” located at the Dorso-Ventral boundary of the disc. 2) The microRNA *miR-7* controls wing size and cell size, most likely through the direct regulation of *dacapo* and *dRYBP* expression, and probably through the indirect, regulation of *cut*, *senseless* and the Notch pathway. 3) The microRNA *miR-306* controls wing size. Low levels of *miR-306* decrease the size of the wing and the size of its cells. High levels of *miR-306* induce cell death, which is dependent on *Dp53* levels, and also produce L5 wing vein shortening. 4) The microRNA *miR-306* controls the expression of *abrupt*, a BTB-ZF transcription factor, presumably by direct regulation. The 3'UTR of *abrupt* contains one binding site for *miR-306* that is responsive to high levels of *miR-306*, and also the overexpression of *miR-306* in the wing imaginal disc cells represses *abrupt* expression in those cells. 5) The *abrupt* gene regulates the growth of the wing and the haltere by controlling cell size as well as cell cycle progression, having a bigger impact on the G1-S phase progression. 6) Neither abrupt overexpression nor *abrupt* inactivation in the haltere imaginal discs affect Ultrabithorax expression. However, *abrupt* and *Ultrabithorax* could still collaborate to promote haltere growth. 7) *abrupt* controls wing and haltere size by regulating *Cyclin D-Cdk4* and *Cyclin E-Cdk2* expression, since high levels of these complexes and low levels of *dacapo* rescue the wing size reduction caused by the inactivation of *abrupt*. 8) *dBre1* has an anti-apoptotic function which is dependent on *Dp53* and *dRYBP* levels. 9) *Sce* has an anti-apoptotic role dependent on *Dp53* levels. The inactivation of *Sce* function induces cell death, which is decreased when *Dp53* function is inactivated. Overexpression of *Sce* does not affect wing development. However, it inhibits the apoptosis induced by either high levels of *DP53* or high levels of *dRYBP*. 10) High levels of *Sce* inhibit X-ray-induced-apoptosis and apoptosis associated with tumoral growth. It is proposed that high levels of *Sce* promote cell survival during tumoral development.

RESUMEN EN CASTELLANO

RESUMEN EN CASTELLANO

El crecimiento de los tejidos y de los órganos requiere la acción conjunta y coordinada de varios procesos como el crecimiento de la célula, la división celular, la apoptosis y la diferenciación celular, los cuales en última instancia, están regulados por la expresión espacio-temporal de los genes implicados. La convergencia entre los estímulos externos y los internos desencadena una respuesta en las células llevándolas a activar y/o reprimir un programa determinado de genes que será el que orquestrará el correcto desarrollo del organismo. Defectos en el control de la expresión de estos programas de genes conlleva enfermedades tales como el cáncer o la malformación de las extremidades y los órganos.

En este trabajo de Tesis, se ha utilizado la mosca *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para analizar los mecanismos involucrados en el control del crecimiento y de la muerte celular. Para ello, se ha estudiado la función de los microRNAs *miR-7* y *miR-306*, la función del gen *abrupt* que codifica un factor de transcripción de la familia BTB-ZF y la función de los factores epigenéticos *dBre1*, del grupo trithorax y *Sce* (Sex comb extra) del grupo Polycomb. Las conclusiones principales de este trabajo de Tesis son: 1) La expresión del microRNA *miR-7* se detecta en todas las células del disco imaginal de ala, siendo su expresión más elevada en las “non-boundary cells” que componen el borde Dorso-Ventral del disco. 2) El microRNA *miR-7* controla el tamaño del ala y el tamaño de sus células mediante la regulación, probablemente directa, de *dacapo* y de *dRYBP*, así como mediante la regulación indirecta de *cut*, *senseless* y la vía de Notch. 3) El microRNA *miR-306* controla el crecimiento del ala. Bajos niveles de *miR-306* reducen el tamaño del ala y el tamaño de sus células. Altos niveles de *miR-306* inducen muerte celular dependiente de los niveles de *Dp53* y, además, acortan la longitud de la vena L5 en el ala. 4) El microRNA *miR-306* regula, probablemente de forma directa, la expresión de *abrupt* que codifica un factor de transcripción de la familia BTB-ZF. El 3'UTR de *abrupt* contiene un sitio de unión a *miR-306* que responde a altos niveles de *miR-306* y la sobre-expresión de *miR-306* reprime la expresión de *abrupt* en el disco imaginal de ala. 5) *abrupt* regula el crecimiento del ala y del halterio controlando el tamaño celular así como la progresión del ciclo celular, incidiendo principalmente en la progresión de la fase G1-S. 6) La sobre-expresión y la inactivación de *abrupt* no afecta la expresión de Ultrabithorax en el disco imaginal de halterio. Sin embargo, *abrupt* y *Ultrabithorax* podrían colaborar en el crecimiento del halterio. 7) *abrupt* controla el tamaño del ala y del halterio a través de la regulación de la expresión de *Ciclina D-Cdk4* y *Ciclina E-Cdk2*. Además altos niveles de estos factores y bajos niveles de *dacapo* rescatan la disminución del tamaño del ala debida a la inactivación de *abrupt*. 8) *dBre1* tiene una función anti-apoptótica dependiente de los niveles de *Dp53* y de los niveles de *dRYBP*. 9) *Sce* tiene una función anti-apoptótica dependiente de los niveles de *Dp53*. La inactivación de la función de *Sce* induce muerte celular la cual disminuye cuando se inactiva la función de *Dp53*. La sobre-expresión de *Sce*, que no afecta al desarrollo del ala, inhibe la apoptosis inducida por altos niveles de *DP53* y por altos niveles de *dRYBP*. 10) Los altos niveles de *Sce* inhiben la apoptosis inducida por rayos-X y la apoptosis asociada al crecimiento tumoral. Se propone que los altos niveles de *Sce* promueven la supervivencia celular en condiciones tumorales.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un organismo multicelular se origina a partir de una única célula que, tras la fecundación y durante un periodo de tiempo determinado dependiendo de la especie, sufre una serie de cambios morfológicos. Al final, las características morfológicas que presenta el organismo adulto son el resultado de la acción conjunta de los procesos de proliferación, diferenciación y morfogénesis que han tenido lugar durante la etapa de desarrollo. Una de las preguntas más interesantes de la Biología del Desarrollo, la disciplina que se encarga de estudiar e integrar todos estos procesos y mecanismos, es de qué manera detecta el organismo el tamaño que debe alcanzar, cuándo y cuánto debe proliferar y en qué momento debe parar de crecer. Es decir, cuál es la información que contiene o recibe cada célula para que globalmente se mantenga la proporcionalidad entre los tejidos y los órganos dentro del mismo organismo y así finalmente se alcance una proporción similar entre los individuos de una misma especie.

Lejos de conocer aún una respuesta completa, se sabe que el control del tamaño a nivel individual de órgano depende tanto de factores extrínsecos como intrínsecos (Parker, 2011). Los factores extrínsecos son aquellos que comprenden señales sistémicas como son las hormonas o los nutrientes y ejecutan una señal a través de diversas vías de señalización para acoplar el estado de la nutrición del animal con el crecimiento. Un ejemplo conocido de estos factores es la hormona de crecimiento, que estimula el crecimiento en la mayoría de los órganos a través de la inducción de la expresión del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (Stewart & Rotwein, 1996). La importancia de este factor se refleja, por ejemplo, en los Pigmeos Centro-Africanos, los cuales presentan una disminución en la producción de IGF-1 (Merimee et al., 1981), o en los ratones mutantes para IGF-1, que solo alcanzan un 30% del tamaño y peso normal (Baker et al., 1993).

Por otro lado, los factores intrínsecos que controlan el crecimiento están basados en el programa genético y la localización espacial que presentan cada una de las células que componen el órgano o tejido. Por ejemplo, en los experimentos de trasplante de extremidades en Salamandra (*Salamandra salamandra*) (Harrison, 1924) o de discos imaginales (los primordios que darán lugar a las extremidades, ver más adelante Figura 1B) de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, en los cuales los apéndices trasplantados alcanzan tamaños similares a los que tendrían en su donante (Bryant & Levinson, 1985), indicando que el propio órgano contiene información sobre el tamaño que debe alcanzar. Además, este mecanismo no solo funciona durante el desarrollo sino también durante el crecimiento regenerativo, como se ha observado en *Drosophila* tras irradiar los discos imaginales de ala, los cuales a pesar de sufrir una reducción drástica del número de células, las alas alcanzan el tamaño esperado (Haynie & Bryant, 1977).

En conjunto, todos estos factores extrínsecos e intrínsecos confluyen durante el desarrollo para promover el crecimiento, entendido éste como un aumento de masa durante un tiempo determinado. El nivel más basal de regulación del crecimiento es el que ocurre a nivel celular, determinado por el control del ciclo celular y la síntesis de proteínas (revisado en Weinkove & Leever, 2000). De manera general, el crecimiento de un órgano va acompañado de un aumento del número de células, sincronizando así el crecimiento con el ciclo celular (Johnston & Gallant, 2002). Por lo tanto, el tamaño final de un órgano o individuo no solo viene

determinado por el crecimiento, sino también está controlado por otros procesos como la muerte celular programada o apoptosis (revisado en Conlon & Raff, 1999). La apoptosis se desencadena en una célula cuando por ejemplo no recibe los factores de supervivencia necesarios. Un ejemplo clásico de control de crecimiento a través de la muerte celular ocurre durante el desarrollo de la Hidra. En condiciones en las que escasean nutrientes, la Hidra (*Hydra*) cesa su crecimiento a través de un incremento en la apoptosis a pesar de que sus células continúan dividiéndose con normalidad (Bosch & David, 1984).

Así pues, estudiar el proceso de crecimiento y control del tamaño durante el desarrollo es una cuestión importante no solo para entender la morfogénesis sino también para el estudio de la etiología y los mecanismos que promueven muchas enfermedades tales como el cáncer, defectos congénitos como las extremidades malformadas o los casos en los que ocurren la ausencia o atrofia de órganos vitales. Dadas la ventajas que presenta como sistema modelo *Drosophila melanogaster*, muchos de los estudios de la regulación del tamaño se han llevado a cabo en este sistema modelo.

1. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo

Fue Thomas Hunt Morgan, hace más de un siglo, quien introdujo la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, como sistema modelo para el estudio de la Biología del Desarrollo. *Drosophila melanogaster* es un sistema muy útil para el estudio de todos los mecanismos implicados en el crecimiento y desarrollo de los organismos, ya que posee unas características biológicas idóneas como son su pequeño tamaño (3-4mm), su corto ciclo de desarrollo ya que alcanzan la etapa adulta rápidamente (10 días a 25°C); su reducido número de cromosomas (4 pares de cromosomas frente a 23 pares en humanos o 20 pares en ratón) y su elevada fertilidad, una hembra puede poner hasta 100 huevos por día. Además, cuenta con cromosomas de gran tamaño (politénicos) en los tejidos larvarios que resultan de gran utilidad para estudios citogenéticos. También destaca de la mosca el hecho de que no solo los genes sino también las vías de señalización que regulan su desarrollo están muy conservadas a lo largo de la evolución (Vidal & Cagan, 2006). El uso de *Drosophila*, durante todos estos años en el estudio de mecanismos que regulan el desarrollo, ha promovido la generación de herramientas experimentales únicas, tanto genéticas como moleculares, que no están disponibles en ningún otro organismo modelo, haciendo de la mosca del vinagre un modelo biológico de elección. Además, los estudios en *Drosophila* son trasladables al estudio de la etiología de las enfermedades humanas, ya que por ejemplo se sabe que entorno al 75% de los genes por ahora descritos causantes de enfermedades en humanos presentan homólogos funcionales en *Drosophila* (Pandey & Nichols, 2011; St Johnston, 2002).

El ciclo de desarrollo de *Drosophila melanogaster* se completa aproximadamente en 10 días, a 25°C, tras los cuales surge una mosca adulta (Figura 1A). En la primera fase tiene lugar el desarrollo embrionario, que dura aproximadamente 24 horas desde que el huevo es fecundado. Una vez completada la anterior fase, el embrión eclosiona y comienza la etapa larvaria que dura aproximadamente 4 días. La larva pasa por tres estadios distintos en los que va aumentando su tamaño y durante los cuales se produce la proliferación de los 19 discos imaginales que, en total, posee en el interior de su cuerpo (Figura 1B, revisado en Beira & Paro, 2016). Los discos imaginales son estructuras de tejido epitelial con forma de saco que provienen de la invaginación del ectodermo embrionario. Cada disco está compuesto por las células del disco propio, que forman una mono-capa de epitelio columnar y las células

escamosas de la membrana peripodial (revisado en Beira & Paro, 2016). Tras concluir el desarrollo, la larva deja de comer y se queda inmóvil, endureciendo su cutícula, comenzando así la etapa de desarrollo de la pupa, que dura los cinco días restantes del ciclo y en la que tiene lugar la metamorfosis que dará lugar a la mosca. Durante la metamorfosis, las células del propio disco darán lugar a las estructuras correspondientes en la mosca adulta tales como las patas o las alas mientras que la membrana peripodial de los discos tiene escasa contribución en las estructuras adultas (Ashburner, 1989, revisado en Beira & Paro, 2016). Además, durante este periodo pupal también tiene lugar la proliferación de los histoblastos abdominales que darán lugar al abdomen de la mosca adulta (Madhavan & Madhavan, 1980).

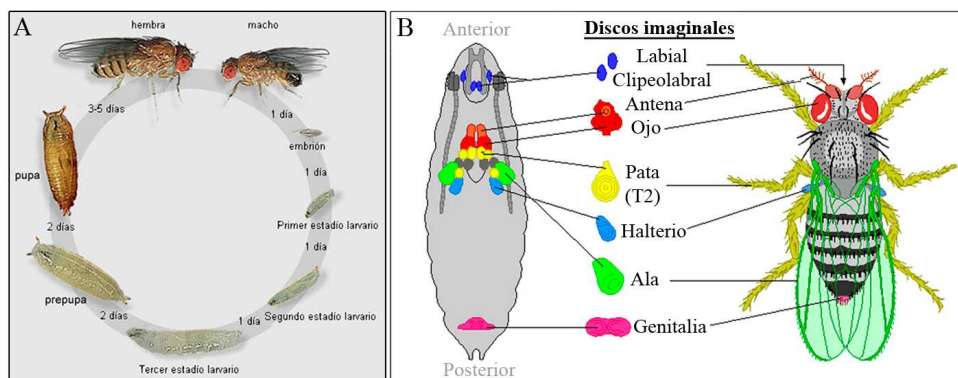


Figura 1: Desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

A) Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* (tomado de Fly-move). **B)** Representación esquemática de los discos imaginales de *Drosophila* mostrando sus posiciones relativas en la larva y las estructuras adultas a las que darán lugar tras la metamorfosis. (Modificado del Dr. Brian E. Staveley, Memorial University of Newfoundland).

2. Morfogénesis de *Drosophila*

El patrón corporal de *Drosophila*, como en muchos otros organismos, está dividido en segmentos. El proceso de segmentación comienza muy temprano en el desarrollo y está mediado por la expresión de una serie de genes, muchos de los cuales codifican factores de transcripción, que actúan secuencialmente durante el desarrollo del embrión. Inicialmente se establece el eje Antero-Posterior (A/P) embrionario, definido por la acción de los genes maternos que regulan la expresión de los genes “gap”, que a su vez controlan la expresión de los genes “pair rule” (Lawrence, 1992). Los genes “pair-rule” se expresan en siete bandas complementarias y su actividad combinatoria determina los valores de información posicional a lo largo del eje A/P en el que se basa el patrón definitivo de catorce parasegmentos embrionarios (Lawrence, 1992). Un parasegmento (PS) es la unidad metamérica funcional durante el desarrollo embrionario, es decir, cada PS se comporta como una unidad de desarrollo independiente que está bajo el control de un grupo particular de genes. Una vez establecido el número de parasegmentos, los genes de “polaridad segmental” especifican los compartimentos dentro de cada parasegmento. Así, cada parasegmento se compone del compartimento posterior de un segmento y el compartimento anterior del segmento siguiente (Martinez-Arias & Lawrence, 1985). Tanto los genes “pair-rule” como los genes de “polaridad segmental”, como es el caso del gen *engrailed*, establecen los límites de expresión de los genes homeóticos (Hox), que otorgan identidad a cada uno de los segmentos (Lawrence, 1992).

Los genes Hox se agrupan en dos complejos: Antennapedia (Ant-C) y Bithorax (BX-C). Es la acción conjunta de ambos complejos la que controla la diversidad morfológica de los segmentos del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978), determinando las estructuras que han de formarse en cada segmento, y por tanto, definiendo su propia identidad (Duncan, 1987; Lewis, 1978), con excepción de la analia, la cual está controlada por el gen *caudal* (Moreno & Morata, 1999). El BX-C está formado por tres genes, en orden próximo-distal respecto al centrómero: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sanchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985) los cuales otorgan la identidad desde el PS5 al PS13 (Martinez-Arias & Lawrence, 1985) que abarca el tercer segmento torácico y los ocho segmentos abdominales. Por ejemplo, la expresión del gen *Ubx* en el tercer segmento torácico promueve que las células del disco de halterio se especifiquen como halterio en la región dorsal de la mosca, y que las células de pata tercera (p3), se especifiquen como tal en la región ventral. La importancia de los genes homeóticos en la otorgación de la identidad celular se pone de manifiesto al variar sus niveles de expresión. Los genes Hox codifican factores de transcripción muy conservados en la evolución que se expresan en epidermis, sistema nervioso central (SNC) y mesodermo visceral y somático (Celniker et al., 1989; DeLorenzi et al., 1988; Karch et al., 1990; Kornfeld et al., 1989; Zavortink & Sakonju, 1989) y coordinan la actividad de otros genes, organizando el desarrollo de los tejidos en los que se expresan de animales tan distintos como vertebrados, moscas o gusanos (Akam et al., 1994; Krumlauf, 1994).

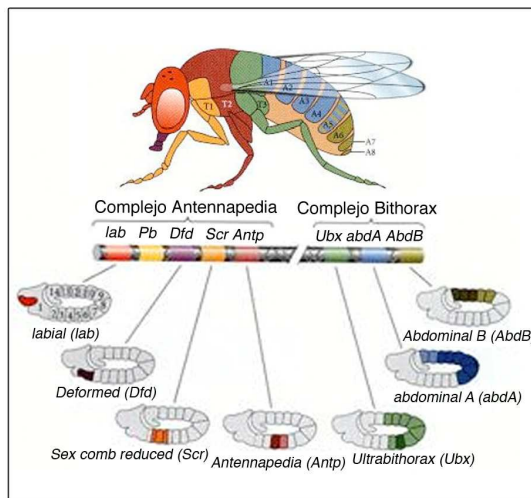


Figura 2: Los genes homeóticos.

Representación esquemática de la posición próximo-distal de los genes homeóticos o Hox en el cromosoma y sus dominios de expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo del embrión y de la mosca (modificado de Gilbert, 2000).

Desde muy temprano en la embriogénesis, la expresión de los genes homeóticos se restringe a dominios específicos, mostrando un límite de expresión muy definido en una posición determinada a lo largo del eje A/P del embrión (Figura 2). Se establece, por tanto, un dominio donde los genes homeóticos están activados y un dominio donde están reprimidos. Ambos dominios se tienen que mantener en la misma posición a lo largo del desarrollo, ya que variaciones en la expresión de los genes Hox en cualquier momento del desarrollo conlleva transformaciones fenotípicas severas y, en muchos casos, letalidad. Como se ha mencionado anteriormente, estos dominios de expresión de los genes homeóticos se establecen por los genes de segmentación, que solo se expresan durante las cuatro primeras horas del desarrollo (Jackle et al., 1992), mientras que los genes homeóticos se expresan y requieren funcionalmente a lo largo de todo el desarrollo. Así pues, el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo es llevado a cabo por otro grupo de genes: los

genes de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) (Jürgens, 1985; Lewis, 1978), siendo los primeros, los responsables de mantener los estados transcripcionales reprimidos y los segundos, los encargados de mantener los estados transcripcionales activados (Kennison & Tamkun, 1988).

3. Control del tamaño de los órganos

Durante la morfogénesis de *Drosophila*, se genera el patrón corporal que dará lugar a una mosca con un número determinado de órganos como por ejemplo son: dos ojos, seis patas y dos alas. Para que se desarrollen correctamente, debe haber un balance entre la activación y la represión de los mecanismos de proliferación tanto para poder alcanzar el tamaño esperado como para terminar el proceso una vez alcanzada la dimensión apropiada. De lo contrario, fallos en los procesos de regulación de la proliferación dan lugar a malformaciones del patrón morfológico y a alteraciones del tamaño final de los órganos y organismos.

Los mecanismos de proliferación en *Drosophila* comienzan en la fase embrionaria cuando, tras la fecundación, el embrión es un sincitio nuclear donde ocurren 13 divisiones nucleares rápidas y altamente sincronizadas y sin citoquinesis, es decir, los núcleos comparten un citoplasma común. Durante esta etapa, no hay transcripción y todo depende de la maquinaria de replicación que haya sido depositada por la madre en el huevo. Una vez completado el decimotercer ciclo, el embrión comienza la transcripción, la generación de membranas celulares y la proliferación celular. Las 4 divisiones celulares restantes del embrión siguen un patrón determinado y la progresión de los ciclos está muy regulada por diversos factores durante el desarrollo (revisado en Thompson, 2010).

Una vez completado el desarrollo embrionario, la larva puede alimentarse por sí misma y esto conlleva un gran aumento de las tasas proliferativas. Por un lado, los tejidos del cuerpo larvario soportan un gran aumento en masa durante los 3-4 días de desarrollo, según el acceso a nutrientes que tengan. Como necesita aumentar de volumen en un corto periodo de tiempo, las células del cuerpo aumentan su tamaño pero no se dividen. A este proceso se le llama endoreplicación y consiste en la replicación del genoma nuclear en ausencia de mitosis. Este proceso está dirigido en gran medida por el cerebro debido a que libera hormonas dILP (insulin-like peptide) activando al receptor de insulina a través de las vías de señalización como por ejemplo las vías de PI3K/Akt y TORC1 para estimular el crecimiento y también regular la biogénesis de los ribosomas para así controlar la transcripción de los genes (revisado en Hietakangas & Cohen, 2009; Thompson, 2010). Al mismo tiempo, durante el crecimiento larvario, ocurre la proliferación de los discos imaginales dentro del cuerpo de la larva. En este caso, las rondas de división sí están acopladas al crecimiento celular y el ciclo celular pasa por sus cuatro fases como se han descrito clásicamente: G1, S, G2 y M. Como ocurre con los tejidos endoreplicativos, el crecimiento de la célula está condicionado por la alimentación de la larva. De modo que las larvas que no adquieren los suficientes nutrientes dan lugar a moscas pequeñas debido a que el tamaño de sus células son más pequeñas (revisado en Hietakangas & Cohen, 2009; Thompson, 2010). Resulta interesante que en algunos casos, la alteración de la vía de la Insulina no solo reduce el tamaño de las células sino también reduce el número de células totales en el tejido. Por ejemplo, cuando se reducen los niveles de *Chico*, el único homólogo en *Drosophila* de los Sustratos de Receptores de Insulina de mamíferos (en inglés, IRS) se produce una reducción tanto del tamaño como del número total de células (Bohni et al., 1999, revisado en Coelho & Leivers, 2000). Por el contrario, los mutantes de *DS6K*, una

quinasa también implicada en la vía de la Insulina, a pesar de inducir la reducción del tamaño celular no presentan variación en el número final de células en el tejido (Montagne et al., 1999, revisado en Coelho & Leever, 2000). Estos dos ejemplos ilustran la importancia de la coordinación del crecimiento tanto a nivel celular como tisular para poder alcanzar las dimensiones esperadas. En última instancia, las diferentes proporciones que los órganos adultos de la mosca presentan como el ojo, la pata o el ala son controladas por distintas señales de posición y factores de transcripción que son expresados en patrones concretos durante el desarrollo larvario. A continuación se explica cómo se desarrollan los discos imaginales de ala y de halterio.

3.1 Desarrollo del ala

El disco imaginal de ala da lugar al *notum* y al ala, propiamente dicha, de la mosca (Figura 3A). Constituye un excelente modelo para estudiar los mecanismos que controlan el tamaño de los órganos debido al cada vez más extenso conocimiento que se tiene sobre las vías y efectores que controlan su crecimiento, además de ser un epitelio plano que simplifica su estudio. El ala se origina a partir de un grupo de 30-40 células existentes en el primordio del disco imaginal que ya se encuentra en el embrión y que durante el desarrollo larvario proliferan hasta alcanzar un número aproximado de 50 000 células (revisado en Herranz & Milan, 2008). El programa de proliferación de estas células está dirigido por la expresión de una serie de morfógenos y factores de transcripción que, finalmente regulan la progresión del ciclo celular (revisado en Cadigan, 2002; Strigini & Cohen, 1999).

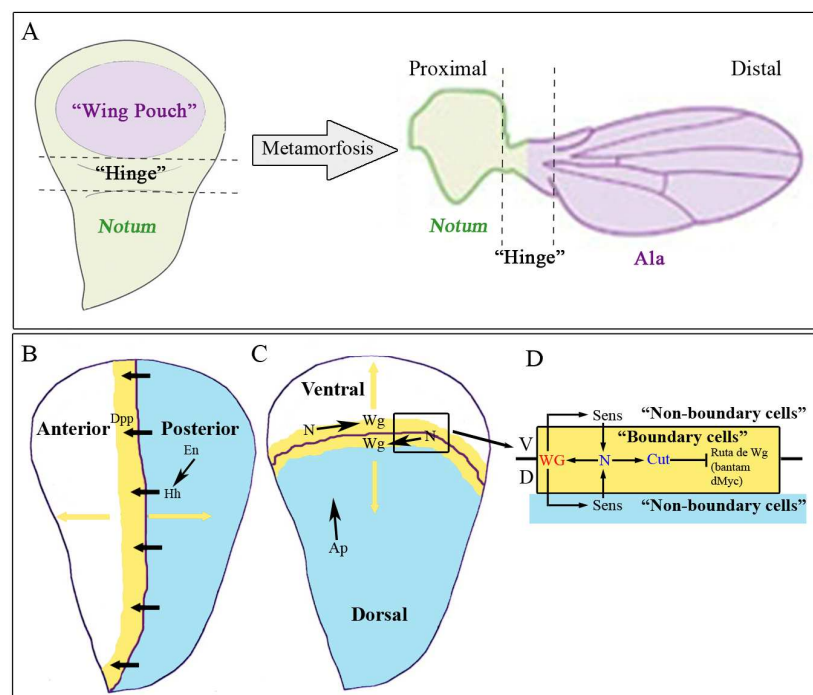


Figura 3: Desarrollo del disco imaginal de ala.

A) Representación esquemática de los territorios celulares del disco imaginal de ala que tras la metamorfosis dará lugar a las correspondientes estructuras adultas del ala y *notum* (Modificado de Dekanty & Milan, 2011). **B)** Formación del borde Antero-Posterior (A/P) mediado por las proteínas Engrailed (En) y Hedgehog (Hh), que inducen la expresión del morfógeno Decapentapleptegic (Dpp) el cual promueve el crecimiento del disco. **C)** Formación del borde Dorso-Ventral (D/V) mediado por las rutas de señalización Notch (N) y Wingless (Wg). La expresión restringida de la proteína Apterous (Ap) en las células dorsales promueve la formación del borde Dorso-Ventral. Las

interacciones entre las células dorsales y ventrales resultan en la activación de Notch (N) a lo largo del borde D/V, que a su vez induce la expresión de Wingless (Wg) y la expresión de Cut en estas células. **D)** Ruta de señalización de Notch en el borde D/V. La expresión de la proteína Notch en las “boundary cells” ocurre tras la confrontación de las células dorsales y ventrales, y su activación da a su vez lugar a la activación del morfógeno Wg y el factor de transcripción Cut. El morfógeno Wg difunde a lo largo del borde D/V, activando la expresión de Senseless (Sens) y dando lugar a la formación de la zona determinada “non-boundary cells”.

Durante el desarrollo del disco, se forman los compartimentos Anterior, Posterior, Dorsal y Ventral, y es justo en los bordes de esos compartimentos del disco donde se forman “centros de organización del crecimiento” (revisado en Herranz & Milan, 2008). Por un lado, el borde Antero-Posterior (A/P) se forma ya en estadio embrionario, dirigido por la expresión del gen *engrailed* (*en*) en el compartimento posterior (Brower, 1986). La expresión diferencial de *en* activa la producción del morfógeno Decapentaplegic (Dpp, homólogo de TGF- β en vertebrados) en el borde A/P (Hidalgo, 1994; Sanicola et al., 1995). Su función como morfógeno es difundir a lo largo del borde induciendo la activación de una serie de genes en las células adyacentes, promoviendo su proliferación (Posakony et al., 1990) (Figura 3B). Por otro lado, la especificación de las células Dorsales y Ventrales se genera durante el segundo estadio larvario iniciado por la expresión diferencial del factor de transcripción Apterous (Ap) (Blair et al., 1994; Diaz-Benjumea & Cohen, 1993). La formación del borde Dorso-Ventral (D/V) es promovido durante el tercer estadio larvario por la confrontación entre las células dorsales y las ventrales, induciendo la activación de la ruta de señalización de Notch en el borde D/V (de Celis et al., 1996) y formando la zona de no proliferación (ZNC), en la cual las células se caracterizan porque no progresan en el ciclo (O'Brochta & Bryant, 1985) (Figura 3C). De esta forma el borde D/V se compone de dos poblaciones de células: las células propias del borde o “boundary cells” y las células adyacentes al borde o “non-boundary cells”. La activación de la vía de Notch en las “boundary cells” activa la expresión de distintos genes, entre los que se encuentra el gen *wingless* (*wg*) (Neumann & Cohen, 1996). El morfógeno Wg difunde desde las “boundary cells” hacia las “non-boundary cells” de ambos lados del borde (Neumann & Cohen, 1996; Zecca et al., 1996), promoviendo la detención del ciclo en la fase G2 de las células al inhibir la activación de String, una fosfatasa requerida para la progresión G2-M del ciclo celular (Herranz et al., 2008; Johnston & Edgar, 1998). Mientras las “boundary cells” se encuentran retenidas en la fase G1, donde Notch también induce la expresión del factor de transcripción Cut (Jack et al., 1991; Neumann & Cohen, 1996), el cual finalmente provoca la represión de Wg en las “boundary cells”. Además, Cut inhibe la proliferación celular a través de la represión del proto-oncogén *dMyc* y el microRNA *bantam*, responsables del crecimiento del disco imaginal de ala (Micchelli et al., 1997, revisado en Herranz & Milan, 2008) (Figura 3D). De esta forma, mediante el control del ciclo celular que promueve o detiene la proliferación, se llega a formar un ala organizada en varios compartimentos y con un tamaño y morfología determinada.

3.1.a Formación del patrón de las venas

La organización espacial de las células en el disco de ala también define el patrón que presenta el ala adulta con sus órganos sensoriales y venas. Las venas adultas presentan morfología de tubo de células ectodérmicas compactas, con una cutícula más oscura y de mayor tamaño que las regiones de intervenas adyacentes. Las venas no solo sirven para dar soporte estructural al ala sino también como conducto para la hemolinfa y nervios. El ala de *Drosophila* presenta cinco venas completas (L1-L5), una vena longitudinal incompleta (L6) y

dos venas transversales (anterior y posterior) (Figura 4A). La especificación de cada vena se determina en función de los factores de transcripción específicos que se expresan de manera restringida en cada región presuntiva de vena. En concreto, la especificación del patrón de las venas comienza en el primordio de ala a partir de la coordinación precisa de las cascadas de señalización EGF (Epidermal Growth Factor), Notch y Dpp (Decapentaplegic) (revisado en De Celis, 1998). Durante el tercer estadio larvario se inicia la especificación de los territorios de venas (Sturtevant & Bier, 1995; Sturtevant et al., 1993) y de intervenas (Fristrom et al., 1994; Roch et al., 1998).

La vena L5 (al igual que ocurre con la L2) depende del gradiente de Dpp (Sturtevant et al., 1997). En el caso concreto de la especificación de la vena L5, depende de dos de los genes diana de Dpp como son *brinker* (*brk*) y *optomotor-blind* (*omb*), que colaboran en la iniciación de la formación de la L5. Las proteínas Omb y Brk se expresan en dominios complementarios y general un borde en el que se induce la expresión de *abrupt* (Figura 4B), promoviendo la generación de dicha vena a través de la expresión de *rhomboid* (*rho*) (Biehs et al., 1998; Cook et al., 2004; Sturtevant & Bier, 1995).

En este trabajo de Tesis, se ha analizado el papel del gen *abrupt* en el control del tamaño del ala y halterio, más allá de su papel como especificador de la vena L5.

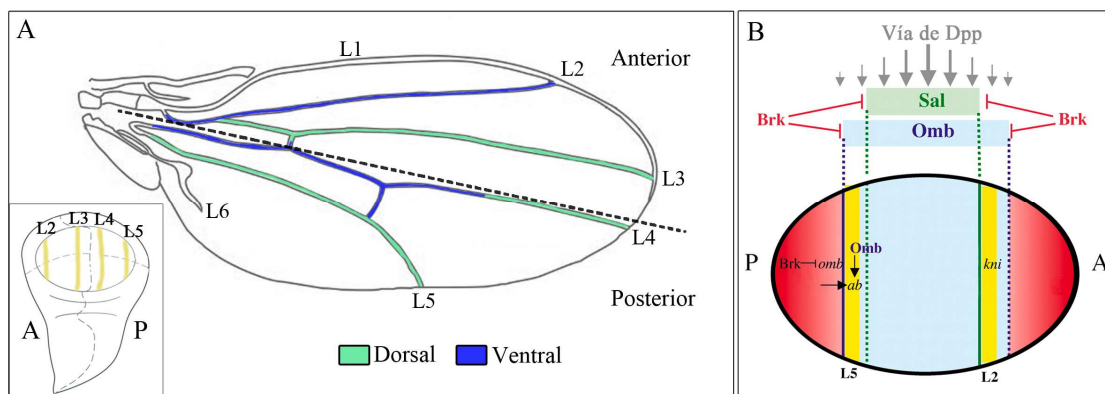


Figura 4: Formación de las venas en el disco imaginal y el ala.

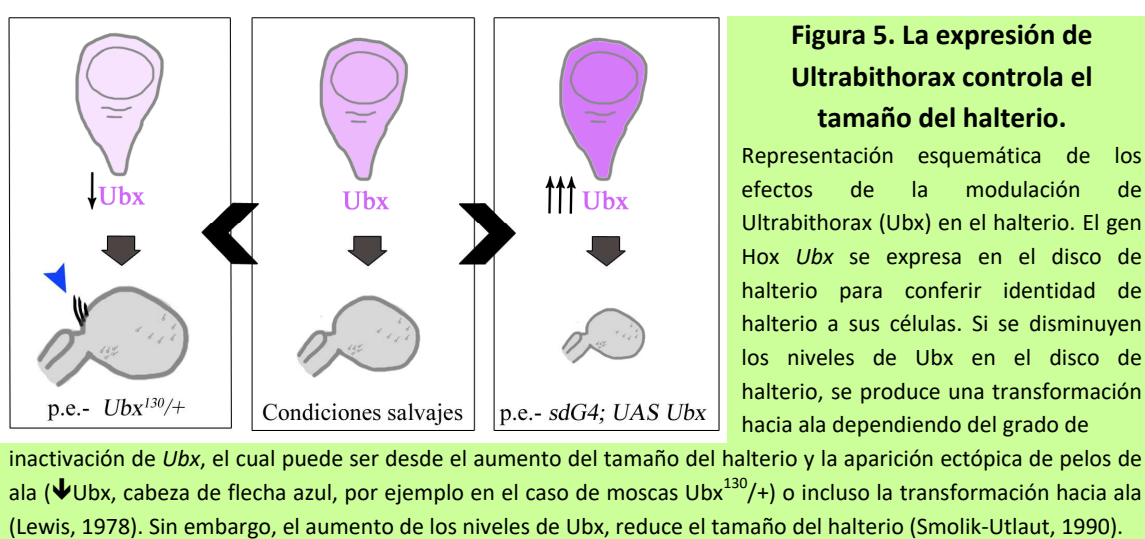
A) Representación esquemática de la posición de las venas en el ala adulta respecto a los ejes A/P y D/V. En el recuadro: posición de las primordios de las venas respecto al eje A/P. **B)** Modelo de inducción de la formación del primordio de la vena L5 en el disco imaginal de ala, se representa el “wing pouch” del disco. Tanto la vena L5 como la vena L2 dependen de la vía de Dpp, la cual induce la expresión de Omb que a su vez es reprimido por Brk. El primordio de la vena L5 viene definido por la expresión de Abrupt (*ab*) en la región posterior de Optomotor-blind (*Omb*) adyacente a Brinker (*Brk*), mientras que el primordio de la vena L2 depende de la expresión de Knirps (*Kni*) en el borde anterior entre *Omb* y *Brk* (Modificado de Cook et al., 2004).

3.2 Desarrollo del halterio

Los halterios de *Drosophila* son unas pequeñas estructuras claviformes que se encuentran localizados posteriormente a las alas y cuya función es mantener el equilibrio durante el vuelo y el movimiento (Pringle, 1948). El halterio se genera a partir de las células del primordio del disco de halterio que se encuentra ya en el embrión y alcanza un número de aproximadamente 10 000 células al final del tercer estadio larvario (Roch & Akam, 2000). A pesar de que las alas y los halterios son fenotípicamente distintos, los discos imaginales de los que provienen presentan una morfología similar, aunque de distinto tamaño. La principal diferencia radica en la expresión diferencial del gen Hox *Ultrabithorax* (*Ubx*) en el disco de

halterio, que otorga la identidad al halterio. En condiciones salvajes, *Ubx* no se expresa en el ala propia (sólo en la membrana peripodial) pero sí en el halterio, donde ejerce su efecto reprimiendo a otros genes promotores de crecimiento y consiguiendo de esta manera que su tamaño sea menor que el del ala.

La importancia del gen *Ubx* en la especificación de la identidad de halterio se manifiesta al analizar los efectos de la modulación de sus niveles (ver Figura 5). Cuando se produce una expresión ectópica de *Ubx* en el ala, se induce una transformación de ala hacia halterio (Gonzalez-Gaitan et al., 1990; White & Akam, 1985). Por el contrario, la falta de expresión de *Ubx* en el halterio induce transformación de halterio hacia ala (Bender et al., 1983; Casanova et al., 1985; Lewis, 1978). Además, se ha descrito que el aumento de la expresión de *Ubx* en el halterio, provoca una reducción del tamaño del halterio (Crickmore et al., 2009; Smolik-Utlaut, 1990).



Las principales diferencias entre el disco de ala y el disco de halterio se empiezan a apreciar durante el tercer estadio larvario, donde no solo se aprecia la diferencia de tamaño promovida por la expresión de *Ubx* en el halterio, sino que también, como se explicó en el anterior apartado (3.1.a), durante esta etapa se especifican los territorios para venas y las células que darán lugar a los tricomas en el disco de ala. En el caso del halterio, la formación de las venas está suprimida (Roch & Akam, 2000; Weatherbee et al., 1998). Las diferencias entre los tejidos de ala y halterio se hacen más evidentes tras la formación de la pupa, momento en el que las células, en el caso del ala, pierden su forma pseudoestratificada y pasan a tener una forma más estrellada, secretando un tricoma por célula (Fristrom et al., 1993; Roch & Akam, 2000). Mientras, en el caso del halterio, las células pasan de presentar el epitelio pseudoestratificado del disco imaginal a presentar una forma más cuboidal y cada célula puede secretar entre uno y cuatro pelos por célula (Roch & Akam, 2000). La expresión de *Ubx* en el halterio modifica la expresión de otros genes implicados en señalización y crecimiento a lo largo del desarrollo, como por ejemplo el control de la cantidad y distribución del morfógeno Dpp o Wg (de Navas et al., 2006; Weatherbee et al., 1998) o el control de la vía de la ecdysona (Pavlopoulos & Akam, 2011).

3.3 Regulación de la proliferación mediante el control del ciclo celular

La proliferación celular es un proceso crítico para la formación de un órgano y, debido a ello, se encuentra muy regulado a través del control de las distintas fases del ciclo celular como se explica a continuación. El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que en la mayoría de los casos termina cuando la célula crece y se divide para dar lugar a dos células hijas. El tipo de ciclo más habitual en eucariotas es aquel que consta de una fase de síntesis llamada “S” donde ocurre la replicación del ADN, una fase mitótica, “M”, donde acontece la división celular y dos fases de crecimiento o espaciadoras (G-gap en inglés) “G1” antes de la fase S, donde se producen los componentes de la maquinaria necesaria para la siguiente fase y “G2” previa a la fase M para aumentar la maquinaria necesaria para dividirse. La maquinaria del ciclo celular se encuentra conservada a lo largo de la evolución, siendo *Drosophila* un buen modelo para estudiar el ciclo celular debido a que presenta una maquinaria más simple, sin tanta redundancia como en vertebrados.

La regulación del ciclo celular se lleva a cabo a partir de los heterodímeros de Ciclinas-Cdks (del inglés, quinasas dependientes de ciclinas). Las ciclinas son las unidades activadoras de las Cdks, las unidades catalíticas que actúan sobre sus dianas induciendo su fosforilación y permitiendo así el paso a la siguiente fase del ciclo (revisado Grana & Reddy, 1995).

Durante la fase G1, la Ciclina D (CycD) es la primera que responde a señales extracelulares para promover crecimiento, se une a Cdk4 para promover entre otros, la fosforilación de la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (Rbf). De este modo, se libera el factor de transcripción E2F1 para que pueda unirse a su compañero de dimerización DP (Dimerization Partner) e inducir la transcripción del regulador principal de la fase G1-S, el complejo Ciclina E-Cdk2 (CycE-Cdk2). El complejo Ciclina D-Cdk4 regula crecimiento pero no promueve directamente la transición G1-S, ya que la sobre-expresión de CycD-Cdk4 en los discos promueve una mayor tasa de crecimiento, pero con un perfil de ciclo similar al de las células salvajes (Datar et al., 2000; Meyer et al., 2000) (Figura 6).

El complejo Ciclina E-Cdk2 es el único que regula la transición de la fase G1 a S en *Drosophila*. Durante la embriogénesis, como se mencionó anteriormente, donde los ciclos ocurren a partir de la maquinaria replicativa depositada por la madre, la Ciclina E está constitutivamente activa (Knoblich et al., 1994). Tras las primeras 16 divisiones del embrión, los niveles de transcritos de Ciclina E disminuyen para inducir una parada o arresto en la fase G1 (Knoblich et al., 1994). Durante el resto del desarrollo, el paso de G1 a S está completamente regulado por los niveles de CycE que al aumentar permiten su unión a la Cdk2 (o cdc2c) formando el complejo CycE-Cdk2 (Lehner & O'Farrell, 1990a). El promotor de la *Ciclina E* contiene múltiples regiones *cis*-reguladoras que responden a distintas señales que controlan su transcripción durante el desarrollo (Jones et al., 2000). A nivel post-transcripcional también se encuentra regulado por otras proteínas como Dacapo (*dap*, homólogo de p21 en mamíferos), la cual es una CKI (en inglés, quinasa inhibidora de ciclinas dependiente de quinasas) que regula negativamente al complejo Ciclina E-Cdk2 impidiendo que ocurra la transición G1/S y, por tanto, promoviendo arresto celular (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996) (Figura 6).

Una vez la célula entra en la fase S, los niveles de CycE-Cdk2 disminuyen y empiezan a subir los niveles de Ciclina A y Ciclina B para promover el paso de G2 a M (Lehner & O'Farrell, 1990b). El papel de ambas es redundante y dependen de su interacción con la Cdk1 (o Cdc2),

la cual es fosforilada por la fosfatasa String (Stg, Cdc25 en vertebrados), la proteína limitante para la transición G2-M (Edgar y O'Farrell 1990b). La falta de Stg induce una parada en G2, mientras que su sobre-expresión promueve una entrada rápida en mitosis (Edgar & O'Farrell, 1989; Edgar & O'Farrell, 1990; Neufeld et al., 1998) (Figura 6).

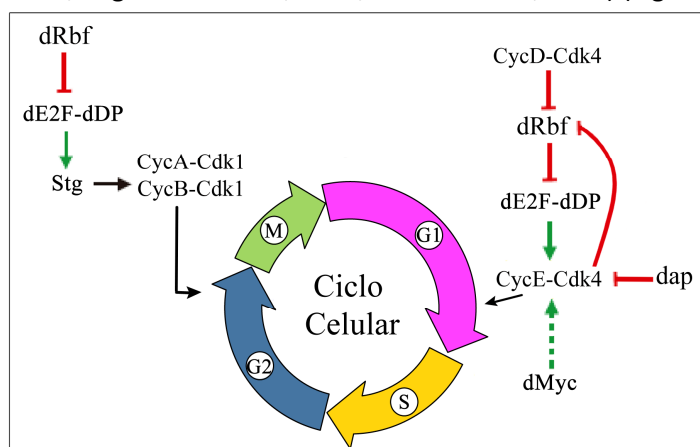


Figura 6. El ciclo celular y su regulación.

Representación esquemática de las fases del ciclo (G1, S, G2 y M) que tienen lugar durante la división celular de las células de los discos imaginales, así como los reguladores requeridos para su funcionamiento de interés para este trabajo. El heterodímero CycD-Cdk4 fosforila a la proteína Retinoblastoma (dRbf) para inhibirla, de este modo, la proteína dE2f puede unirse a su cofactor dDP e inducen la activación del complejo

CycE-Cdk2, necesario para promover el paso G1-S. A su vez CycE Cdk2 es capaz de inhibir la expresión de la proteína dRbf. La quinasa inhibidora de ciclinas dependiente de quinasas, dacapo, regula negativamente al complejo CycE-Cdk2. La proteína dMyc es capaz de promover, entre otros, la activación del complejo CycE-Cdk2. Otra parte crítica del ciclo celular es la transición G2-M, el cual está controlado por la expresión de la proteína String (Stg), la cual activa al complejo formado por CycA-Cdk1 o también CycB-Cdk1.

Así como las transiciones del ciclo están reguladas por la presencia de los complejos de Ciclinas-Cdks, estos a su vez son inactivados por degradación vía proteasoma. El complejo CycE-Cdk2 es degradado por el complejo SCF (Skp1/Culina/F-box - la proteína archipiélago) durante la fase S (Moberg et al., 2001) y los complejos de CycA o CycB-Cdk1 son ubiquitinados para su degradación por el complejo APC (en inglés, complejo promotor de la anafase) para terminar la fase mitótica (revisado en Harper et al., 2002; Lee & Orr-Weaver, 2003). Cuando se detectan fallos en la replicación del ADN, por ejemplo tras la irradiación por rayos-X, la progresión normal del ciclo se para, activándose las quinasas de *Drosophila* Mei-41 (homóloga de Rad3/ATM) y Grapes (*grp*, homóloga de Chk1) que inducen una parada o “checkpoint” para promover un retraso en el ciclo celular, para que se pueda reparar el ADN y la fase S se pueda completar correctamente antes de la mitosis (revisado en Lee & Orr-Weaver, 2003; Melo & Toczyski, 2002).

3.3.a Coordinación entre crecimiento y ciclo celular. Función del gen *dMyc*

El crecimiento celular es la acumulación de masa celular. Generalmente, crecimiento celular y ciclo celular están coordinados de manera que solo ocurre la división celular cuando la célula ha alcanzado un tamaño “crítico”. Para ello, existe un punto de restricción o “checkpoint” en la fase G1, en el cual la replicación no se inicia sin haber alcanzado la masa adecuada. Esto se encuentra suprimido durante los ciclos de divisiones nucleares en el sincitio, cuando apenas hay crecimiento debido al aporte materno, o en el tejido larvario, donde las células crecen mucho de tamaño por endoreplicación (desarrollado en el apartado 3). Sin embargo, durante el desarrollo de los discos imaginales, crecimiento y división están altamente coordinados gracias a los procesos de diferenciación promovidos por las vías de señalización. Un ejemplo de factores involucrados en la coordinación entre crecimiento y

división es el oncogén *dMyc*, homólogo en *Drosophila* de la familia de oncogenes MYC en mamíferos (revisado en Gallant, 2013).

La expresión de los genes *MYC* se encuentra alterada en multitud de tumores y se sabe que su función está implicada tanto en división celular como en diferenciación y apoptosis (Henriksson & Luscher, 1996). En *Drosophila*, alelos hipomorfos para *dMyc* son viables, pero sus fenotipos están relacionados con defectos en el crecimiento. Las moscas son de menor tamaño, con células pequeñas cuya tasa proliferativa solo se ve afectada cuando se reducen drásticamente los niveles de *dMyc* (Johnston et al., 1999, revisado en Gallant, 2013). Sin embargo, la sobre-expresión de *dMyc* aumenta el tamaño celular a pesar de que la duración del ciclo celular no está afectada debido a que se ha visto que *dMyc* puede promover la expresión de CycE-Cdk2 a nivel post-transcripcional, pero no la de String (Prober & Edgar, 2000) (Figura 6). Es decir, en condiciones de sobre-expresión de *dMyc*, el ciclo tiene una transición más rápida de G1 a S, pero String, al ser el factor limitante para pasar de G2 a M, ralentiza el ciclo en esa parte y por tanto, la duración final del ciclo celular resulta similar al de las células salvajes (Johnston et al., 1999). solo cuando se sobre-expresa *dMyc* conjuntamente con String, se observan sobre-crecimientos acompañados por un aumento en la proliferación celular (Johnston et al., 1999).

A su vez, *dMyc* se encuentra regulado por varias vías de señalización como son, entre otras, la vía de Wingless, la vía de Dpp y la vía de la Insulina (Doumpas et al., 2013; Johnston et al., 1999; Prober & Edgar, 2000). La vía de Wg principalmente reprime a *dMyc* en la zona de no proliferación del disco en el borde D/V (Duman-Scheel et al., 2004; Johnston et al., 1999). Además, Wg puede inducir la expresión de *dMyc* en otras partes del disco de ala (Herranz et al., 2008) y la inducción de la expresión de *dMyc* se ha observado en procesos de regeneración cuando se induce daño en el disco (Smith-Bolton et al., 2009). La vía de Dpp activa indirectamente la expresión de *dMyc* a través de la represión de Brinker, uno de los represores directos de *dMyc* para inhibir crecimiento (Doumpas et al., 2013). Y la vía de la Insulina disminuye los niveles de *dMyc*, a nivel post-transcripcional, mediante la quinasa GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3-beta) en condiciones de estrés por falta de nutrientes (Parisi et al., 2011).

Por tanto, *dMyc* es un claro ejemplo de cómo durante el crecimiento de los discos imaginales se evidencia la coordinación entre el crecimiento celular y la división de la célula para mantener la homeostasis del crecimiento del tejido ya que es capaz de influir a ambos niveles. En general, cuando se detectan perturbaciones que conllevan un aumento del número celular, obligatoriamente se requiere una reducción del tamaño celular para mantener la masa del tejido. Por el contrario, alteraciones que producen células de mayor tamaño, deben reducir el número de células. Para esta coordinación, es esencial la función del complejo Warts/Sav (Salvador), el cual limita el tamaño final del tejido al promover parada de proliferación y promover salida del ciclo celular. Cuando se mutan los componentes de este complejo, el aumento de ciclo celular no es compensado por la reducción en tamaño celular y como resultado se observan sobrecrecimientos del tejido (Kango-Singh et al., 2002; Tapon et al., 2002).

3.4 Apoptosis y su regulación

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso que ocurre durante el desarrollo de los organismos necesario para el correcto crecimiento de los tejidos u órganos. De hecho, la

des-regulación de las vías apoptóticas está muy relacionada con la generación de cáncer en vertebrados (Bourdon et al., 2011; Hofstetter et al., 2010; Marcel et al., 2009). La apoptosis no solo funciona en la eliminación de las células que puedan suponer una amenaza para la integridad del organismo, sino también está implicada en la morfogénesis de estructuras corporales, por ejemplo, la formación de los dígitos en mamíferos o en la formación de las patas de *Drosophila* (revisado en Hernandez-Martinez & Covarrubias, 2011; Suzanne & Steller, 2013). Precisamente en *Drosophila*, durante el desarrollo de los discos imaginales de ala y halterio no se detectan niveles significativos de apoptosis. Sin embargo, dos horas más tarde de haber emergido las moscas de la pupa, las células en las regiones de las intervenas del ala son eliminadas por apoptosis (Johnson & Milner, 1987). En el disco de pata y durante el desarrollo pupal, la apoptosis es necesaria para la correcta formación de las articulaciones de las patas (Manjon et al., 2007, revisado en Suzanne & Steller, 2013). Además, la muerte celular se hace relevante en caso de inducción de daño en estos discos, tal y como ocurre en la irradiación con rayos-X para eliminar células potencialmente peligrosas (Haynie & Bryant, 1977).

El núcleo de la maquinaria de *Drosophila* implicada en la muerte celular está conservada filogenéticamente (revisado en Fuchs & Steller, 2011). Los genes pro-apoptóticos *reaper* (*rpr*), *hid* (*head involution defective*) y *grim* (en conjunto, RHG) reprimen la expresión de las proteínas inhibidoras de apoptosis o DIAPs (Hay et al., 1995), permitiéndose así la activación de la caspasa activadora Dronc (*Drosophila* Nedd-2-like Caspase, homóloga de la Caspasa-9 en vertebrados) que se auto-activan a sí mismas y a las caspasas efectoras Dcp-1 (Death Caspase-1) y DrICE (*Drosophila* ICE) homólogas de las caspasas-7 y 3 respectivamente de vertebrados para finalmente inducir la muerte celular (revisado en Fuchs & Steller, 2011) (Figura 7).

La activación de las caspasas iniciadoras puede darse por dos vías distintas (MacKenzie & Clark, 2012): por un lado la vía extrínseca, que se induce cuando se une su ligando al receptor de muerte celular del tipo TNF (Tumor Necrosis Factor) (Guicciardi & Gores, 2009); por otro lado la vía intrínseca, que implica a la mitocondria y desencadena la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas iniciadoras a través de la liberación al citosol del Citocromo C (revisado en Fuchs & Steller, 2011). La activación de la cascada apoptótica también puede estar promovida por la proteína supresora de tumores P53, cuyos mecanismos de actuación se explican a continuación.

3.4.a Función de la proteína DP53 en el proceso de muerte celular

La mayoría de tumores humanos presentan mutaciones en el gen *p53* (Hollstein et al., 1991). Estudios en ratón revelaron que P53 es dispensable para el desarrollo de los individuos, aunque los ratones mutantes homocigotos están más predispuestos a desarrollar tumores neoplásicos (invasivos) tras 6 meses de vida (Donehower et al., 1992). Del mismo modo, en *Drosophila*, las moscas mutantes para Dp53, homólogo de P53 en vertebrados (Jin et al., 2000; Xu et al., 2009), son viables, fértiles y no presentan defectos morfológicos (Brodsky et al., 2004). La activación de la cascada apoptótica intrínseca puede ocurrir por señales o estímulos extracelulares muy variados, como puede ser un daño en el ADN, que activan la expresión del gen *Dp53* o los numerosos factores de transcripción que tienen como diana a los genes RHG pro-apoptóticos. En situaciones de estrés celular la proteína Dp53 activa la vía apoptótica al inducir la expresión de los genes *reaper* y *hid* mediante unión directa a sus promotores (Brodsky et al., 2000; Dichtel-Danjoy et al., 2013). El gen *Dp53* codifica dos isoformas

mayoritarias: DP53 (isoforma completa) y DΔNP53 (proteína truncada en el dominio N-terminal) (revisado en Marcel et al., 2011). La isoforma truncada es la principal isoforma implicada en la proliferación inducida por apoptosis a través de la inducción de *wingless* e induce apoptosis a través de la regulación de *hid*. Mientras, la isoforma completa de Dp53 también induce apoptosis aunque a través de la activación de *reaper* (Dichtel-Danjoy et al., 2013).

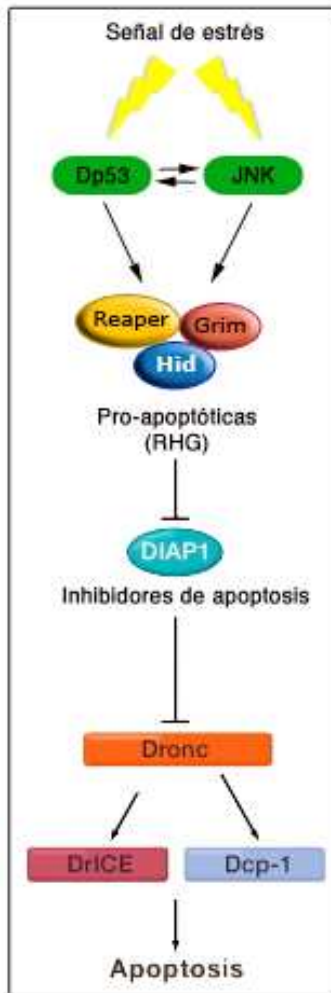


Figura 7: Ruta de activación de la apoptosis en *Drosophila melanogaster*.

En respuesta a una señal de estrés, la vía de JNK así como Dp53 se activan y promueven la activación de la expresión de los genes pro-apoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* (RHG). A su vez, RHG se encarga de inhibir a las proteínas Inhibidoras de Apoptosis (DIAPs), permitiendo la activación de la caspasa iniciadora Dronc (homólogo de la Caspasa-9 de vertebrados) y en consecuencia la activación de las caspasas efectoras Dcp-1 y DrICE, (homólogos de la Caspasa-3 de vertebrados) para ejecutar la apoptosis (Modificado de Fuchs & Steller, 2011).

En condiciones normales de desarrollo, cuando no hay daño, los niveles de expresión del ARNm de *p53* son constantes, mientras que los niveles de la proteína P53 se mantienen bajos mediante el proceso que se conoce como “estabilización de los niveles de P53”. Para ello, P53 es poli-ubiquitinada vía E3-ubiquitin ligasas, lo que promueve su constante degradación vía proteasoma. En vertebrados, la principal E3-ubiquitin ligasa involucrada en la poli-ubiquitinación de P53 es MDM2 (Mouse Double Minute 2) (revisado en Kruse & Gu, 2009; Love & Grossman, 2012). En condiciones de estrés celular, es decir, cuando se requiere la acción de p53, la proteína RYBP (Ring1B and YY1 Binding Protein) entre otras, se une a MDM2 para impedir que siga ejerciendo su función inhibitoria sobre P53 (Chen et al., 2009), de manera que los niveles de la proteína P53 aumentan y es capaz de activar transcripcionalmente a sus genes diana, por

ejemplo el gen pro-apoptótico *OMI* en humanos (Yamauchi et al., 2014) o *reaper* en el caso de *Drosophila* (Brodsky et al., 2000; Green & Kroemer, 2009; Vousden & Lane, 2007). Curiosamente, MDM2 está conservado en casi todas las especies salvo en *Drosophila* y *C. elegans* (Lane & Verma, 2012) a pesar de que tanto P53, como la cascada apoptótica y las proteínas interaccionantes con MDM2, como RYBP, están conservadas. Por tanto, el control de los niveles de Dp53 en la mosca debe ser llevado por otras E3-ubiquitin ligasas. En *Drosophila*, se ha propuesto que las proteínas Bonus (TRIM24 en vertebrados) (Allton et al., 2009; Jain & Barton, 2010) y dSynoviolina (SYNOVIOLIN/HRD1 en vertebrados) (Yamasaki et al., 2007) pueden estar regulando el proceso de estabilización de la proteína Dp53. En este trabajo de Tesis se ha estudiado el papel de las E3-ubiquitin ligasas Sce/dRING y dBre1 en el control de la modulación de los niveles de DP53 para el control de la apoptosis.

4. Mecanismos de regulación de la expresión génica

Existen una gran variedad de mecanismos y moléculas que controlan la expresión génica (revisado en Glubb & Innocenti, 2011). En este trabajo de Tesis se han analizado la función durante el desarrollo de distintos factores implicados en la regulación transcripcional como son los factores de transcripción que controlan la expresión mediante la unión a secuencias específicas de ADN; los microRNAs que controlan los niveles de expresión de los ARN mensajeros; los factores epigenéticos que controlan la expresión mediante modificaciones post-traduccionales de las histonas que influyen en el grado de compactación de la cromatina y por lo tanto en el grado de expresión génica.

4.1 Regulación de la expresión génica mediada por microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas secuencias monocatenarias de ARN endógenas y no codificantes que actúan como represores post-transcripcionales de sus genes diana (revisado en Bushati & Cohen, 2007; Inui et al., 2010). Ejercen su función reguladora a partir de su unión, por complementariedad de bases, generalmente a la región 3' UTR (en inglés, Untranslated Regions, regiones no traducidas) de su mensajero diana. Para ello, requiere que dicha región 3' UTR contenga de 2 a 8 nucleótidos complementarios a la secuencia del miRNA. Los miRNAs pueden bloquear el acceso de los ribosomas y por tanto o bien bloquear la traducción del mensajero o bien inducir directamente la degradación al promover la desadenilación del ARN mensajero (revisado en Bushati & Cohen, 2007; Lucas & Raikhel, 2013). Desde su descubrimiento en 1993 (Lee et al., 1993) en el organismo de *C. Elegans*, los microRNAs se han convertido en materia de estudio debido a que se encuentran presentes en la mayoría de organismos y, además, controlan la expresión génica en la mayoría de los organismos testados. Son sintetizados por la ARN polimerasa II, que da lugar a un pri-microRNA que es procesado por el complejo Microprocesador compuesto por la proteína Drosha con actividad ARNasa y la proteína DGRC8 o Pasha. La molécula de ARN resultante es de menor tamaño y se denomina pre-microRNA, la cual es exportada al citoplasma por la proteína Exportina-5. Una vez allí, vuelve a ser procesada por las proteínas Dicer también con actividad ARNasa y TRBP (TAR binding protein), generando el microRNA maduro de doble cadena. A partir de aquí, Dicer junto con TRBP, la proteína Argonauta y una de las cadenas del microRNA forman el complejo RISC (miRNA-induced Silencing Complex). Suele ser seleccionada la cadena 5'-3' debido a que es base a la cadena con menor estabilidad de bases en la región 5' del dúplex (revisado en Bushati & Cohen, 2007; Winter et al., 2009) (Figura 8).

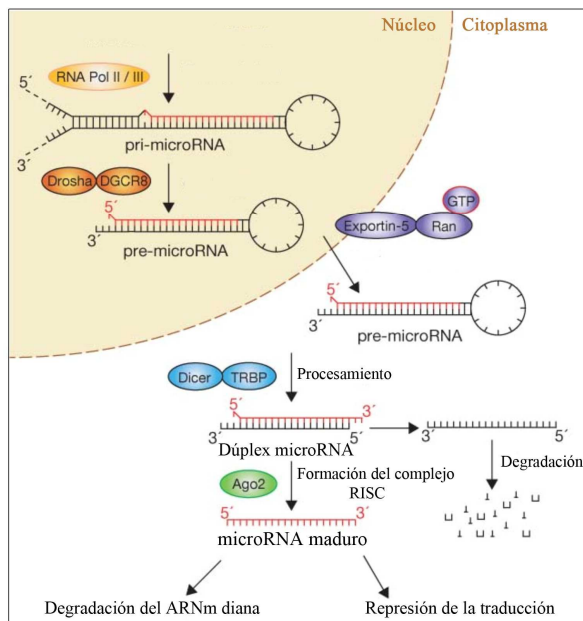


Figura 8: Biogénesis de los microRNAs maduros.

Tras la síntesis y modificación del pri-microRNA en el núcleo se genera el pre-microRNA, el cual es exportado al citoplasma. Una vez en el citoplasma, tiene lugar el procesamiento del pre-microRNA mediante la acción del complejo Dicer-TRBP (TAR binding protein) que elimina la horquilla para generar un microRNA maduro de doble cadena (Dúplex microRNA), siendo seleccionada generalmente la cadena 5'-3', que junto con la proteína argonauta-2 y el complejo Dicer-TRBP forman el complejo RISC encargado de degradar o reprimir la expresión de los ARN mensajeros. (Modificado de Winter et al., 2009).

Un microRNA puede tener centenas de mensajeros dianas, y a su vez un ARN mensajero puede estar regulado por varios microRNAs. Poco a poco se van descubriendo más roles de los microRNAs en la regulación de la expresión génica (revisado en Inui et al., 2010; Lucas & Raikhel, 2013). Desde el descubrimiento de los microRNAs, en *Drosophila* se han predicho más de 200 microRNAs (www.mirBase.org), convirtiendo a la mosca en uno de los mejores modelos para analizar su efectos, ya que se ha corroborado en su implicación en múltiples procesos como el crecimiento del ala (Becam et al., 2011; Bejarano et al., 2012; Herranz et al., 2010; Waldron & Newbury, 2012) o la progresión del ciclo celular (Banisch et al., 2012; Carleton et al., 2007; Hatfield et al., 2005). Durante este trabajo de Tesis se ha analizado el papel de los microRNAs *miR-7* y *miR-306* durante el desarrollo de los discos de ala y halterio de *Drosophila*.

4.1.a *miR-7*

miR-7 es un microRNA que está filogenéticamente conservado en al menos 81 especies (Needhamsen et al., 2014). En humanos existen tres secuencias maduras del *miR-7*: *miR-7-1*, *miR-7-2* y *miR-7-3*. Se ha descrito su función en el control de vías de señalización como la vía de EGFR (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*), la vía del Insulin-like Growth Factor (IGF), y en la vía de señalización mTOR en mamíferos. También en mamíferos, se conoce que controla la expresión de genes reguladores como el factor de transcripción neurogénico PAX6 (Needhamsen et al., 2014) y que el gen *HOXD10* regula la expresión de *miR-7* (Reddy et al., 2008).

En el caso de *Drosophila*, solo hay una secuencia madura y su función se ha estudiado en varios procesos y en distintos tejidos pero no en el desarrollo del ala. Se sabe de su implicación en la diferenciación de los fotorreceptores del ojo a través de la represión de la expresión del factor de transcripción *Yan* (Li & Carthew, 2005), y en la diferenciación de los órganos sensoriales de la mosca a través de la represión de los genes del complejo de *Enhancer of Split* y promover indirectamente la expresión de Atonal (Li et al., 2009). A su vez en el ojo, se sabe

que altos niveles de *miR-7* silencian la vía de Hedgehog y a genes de la vía de Notch (Da Ros et al., 2013). En las ovariolas, se demostró que *miR-7* era requerido para el correcto mantenimiento del ciclo celular de las Células Madre Germinales (GSCs) del ovario, proceso mediado por Dacapo (Dap) (Yu et al., 2009). En las gónadas de los machos, se vió que *miR-7* controla la expresión de *bag of marbles* para promover la diferenciación de sus GSCs (Pek et al., 2009). Por último, se ha demostrado que *miR-7* también promueve el cambio de la fase de endociclos a la fase de amplificación de genes específicos que necesitan las células foliculares del ovario a través de la regulación de *Tramtrack69* (Huang et al., 2013). En el caso del desarrollo del ala, poco se había descrito acerca de la implicación de éste microRNA, solo que su sobre-expresión en los discos imaginales de ala producía alas con “notchings” o muescas (Bejarano et al., 2012).

4.1.b *miR-306*

miR-306 está filogenéticamente conservado entre las especies de insectos como la langosta, el gusano de seda (Jagadeeswaran et al., 2010), las abejas (Macedo et al., 2016) o las mariposas (Ge et al., 2013; Ylla et al., 2016) y en la gran mayoría de especies de la familia de *Drosophila* (www.mirbase.org). Es un microRNA que forma parte de un clúster de microRNAs junto a los miRNAs *miR-9b*, *miR-9c* y *miR-79*. En el caso de *Drosophila melanogaster* lo único que se sabe hasta la fecha es su papel controlando la expresión de *bag of marbles* para permitir la diferenciación terminal de las espermatidas en la espermatogonia (Eun et al., 2013).

4.2 Regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que contienen secuencias específicas de unión a ADN y que tras el reclutamiento de otras proteínas puede controlar positiva o negativamente la transcripción de sus genes diana. Existen varias familias de factores de transcripción dependiendo de los dominios de unión a ADN que presenten, tales como los Homeodominios (HD) o los Zinc Finger (ZF). De entre los 1700-1900 factores de transcripción descritos en humanos, 49 de ellos son clasificados dentro de la familia BTB-ZF (Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac domain- Zinc Finger) (revisado en Maeda, 2016; Siggs & Beutler, 2012).

La función de varios miembros de la familia BTB-ZF ha sido descrito en procesos como la determinación de destino de linaje de linfocitos, hematopoyesis y crecimiento tumoral. El dominio ZF es del tipo C2H2 con función de unión a ADN y dentro de la familia BTB-ZF, el número de dominios ZF varía de 3 a 13 (revisado en Chevrier & Corcoran, 2014) (Figura 9). Los dominios BTB tienen un tamaño aproximado de 120 aminoácidos y generalmente las proteínas de la familia solo presentan una copia de este dominio (revisado en Siggs & Beutler, 2012) (Figura 9). Sirve para la homo- y hetero-dimerización de las proteínas que lo contienen y para reclutar los factores con los que interaccionan para regular la transcripción (revisado en Maeda, 2016).

Uno de los miembros más estudiados en mamíferos de esta familia es la proteína BCL6 (B-Cell Lymphoma 6), que actúa como represor de la transcripción de sus genes diana (revisado en Wagner et al., 2011). BCL6 se encuentra mutado en muchos tipos de cáncer como en linfomas de células B (Basso & Dalla-Favera, 2012), leucemias (Hurtz et al., 2011), cáncer de mama (Bos et al., 2003; Walker et al., 2015), cáncer de estómago (Hirata et al., 2009) o mieloma múltiple (Hideshima et al., 2010). Otro BTB-ZF muy estudiado en mamíferos es

ZBTB7A, también conocido como LRF (Leukemia/lymphoma Related Factor) o POKEMON (POZ and Krüppel Erythroid Myeloid ONtogenic factor) y que se sabe que puede interaccionar con BCL6 (Davies et al., 1999). Los niveles de expresión de ZBTB7A se encuentran aumentados en diversos tipos de cáncer tales como el cáncer de mama (Aggarwal et al., 2010; Qu et al., 2010), de próstata (Aggarwal et al., 2011) o de hígado (Zhang et al., 2013) y cuando se disminuye su expresión, se reduce el desarrollo del tumor. Sin embargo, no todos los BTB-ZF de mamíferos se han descrito como oncogenes, como es el caso de HIC1 (Hypermethylated in Cancer-1), cuyos niveles se encuentran bajos en varios tipos de cáncer (Chen et al., 2003; Wales et al., 1995) e incluso se ha visto que se favorece la progresión tumoral en ausencia de HIC1 (Briggs et al., 2008; Chen et al., 2004; Mohammad et al., 2011).

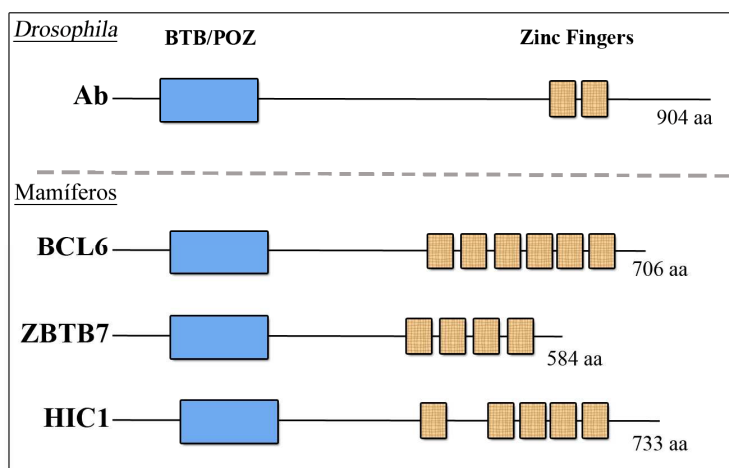


Figura 9: La familia de las proteínas BTB-ZF.

Representación esquemática de la estructura de algunas de las proteínas de *Drosophila* y mamíferos miembros de la familia BTB-ZF. Se indica la posición del dominio BTB/POZ en azul, así como los dominios Zinc Finger de unión a ADN (naranja), cuyo número es variable dependiendo de la proteína.

En *Drosophila*, el gen *abrupt* (Morgan et al., 1925) codifica para una proteína nuclear de 904 aminoácidos (Hu et al., 1995), con dominios BTB-ZF/POZ (Harrison & Travers, 1990) (Figura 9). Fue descubierto al aislar el alelo *ab*¹, mutación hipomorfa en el gen *ab*, cuyas alas no presentaban la vena L5 y su función se estudió en el desarrollo de dicha vena y en las motoneuronas (Hu et al., 1995; Morgan et al., 1925). aunque también, se ha descrito su papel en la formación de las uniones neuromusculares (Hu et al., 1995), en la morfogénesis de dendritas (Hattori et al., 2013; Li et al., 2004; Sugimura et al., 2004) y en la migración de las células del borde del ovario (Jang et al., 2009). Además, se ha visto que los altos niveles de expresión de *abrupt* inducen crecimientos hiperplásicos de los discos de ojo-antena (Grieder et al., 2007; Turkel et al., 2013) y se ha propuesto que *abrupt* actúa como un oncogen epitelial que promueve la des-diferenciación de las células progenitoras del disco de ojo-antena, ya que los crecimientos hiperplásicos generados por altos niveles de *abrupt* se transforman en neoplásicos (invasivos) cuando se combinan con la falta de función del gen *scribbled*, requerido para la correcta polaridad celular apico-basal (Tukel et al., 2013). Por tanto, conocer el mecanismo de acción de *abrupt* es un paso importante para comprender el papel de los BTB-ZF en humanos en la tumorigénesis. En este trabajo de Tesis se ha estudiado la función de *abrupt* en el control del tamaño de los órganos.

4.3 Regulación de la expresión génica mediada por los factores epigenéticos de la familia Polycomb y trithorax.

Las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) están conservadas a lo largo de la evolución y son proteínas nucleares asociadas a cromatina que se expresan ubicuamente a lo largo del desarrollo. Actualmente, se conoce que estas proteínas regulan el mantenimiento de la expresión genómica global de una gran variedad de genes, implicados en múltiples procesos biológicos como morfogénesis, hematopoiesis, mantenimiento de la pluripotencialidad de las células troncales, control de la proliferación celular y tumorigénesis (Ferres-Marco et al., 2006; Martinez & Cavalli, 2006; Oktaba et al., 2008; Pietersen & van Lohuizen, 2008; Probst et al., 2009; Remillieux-Leschelle et al., 2002). Los mecanismos por los que actúan estas proteínas están siendo muy estudiados debido a su importancia global en la regulación de la expresión génica y también, debido al importante papel que juegan en el desarrollo normal y en el desarrollo patológico.

Los genes del grupo Polycomb (PcG) son requeridos para el silenciamiento génico mientras que los genes del grupo trithorax (trxG) son requeridos para mantener los estados transcripcionales activados. Además, existe una tercera clase de proteínas denominadas ETPs (Enhancer of Trithorax and Polycomb) capaces de interaccionar con ambos grupos modulando la función de los represores (PcG) y de los activadores (trxG) (Bejarano & Busturia, 2004; Busturia et al., 2001; Faucheux et al., 2003). Un integrante de este último grupo es la proteína conservada filogenéticamente, dRYBP (*Drosophila* Ring and YY1 Binding Protein) (Bejarano et al., 2005; Gonzalez et al., 2008). En conjunto, las proteínas PcG, trxG y ETPs regulan la expresión génica mediante la modificación de la compactación de la cromatina. Esto lo hacen gracias a sus diferentes actividades bioquímicas que promueven la modificación post-traducciona de las histonas, como son por ejemplo la ubiquitinación o la metilación, que en última instancia cambian el grado de compactación de la cromatina, y por tanto, modulan los niveles de transcripción génica. En *Drosophila* se conoce que las proteínas PcG y trxG reconocen a sus genes diana por la presencia en sus secuencias génicas de elementos de respuesta a Polycomb o PREs y elementos de respuesta a trithorax o TREs (Simon et al., 1993). Los PREs/TREs son secuencias de ADN de unas 100-300 pb a las que se unen las proteínas PcG y trxG y se pueden encontrar cerca o lejos de las regiones promotoras de los genes sobre los que actúan (Chiang et al., 1995; Mishra et al., 2001). En muchos casos, las secuencias de los PREs solapan con las secuencias de los TREs (Tillib et al., 1999), de este modo se facilitan las interacciones entre las proteínas PcG, trxG y los ETPs para ejercer sus funciones reguladoras. Las proteínas PcG/trxG forman diversos complejos multiméricos con distinta actividad bioquímica, según las proteínas integrantes del complejo (revisado en Muller & Verrijzer, 2009). Entre los PcG, los complejos mejor caracterizados son el PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) encargado de reclutar y anclar al PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) (Czermin et al., 2002). El complejo PRC1 contiene, entre otras, la E3-ubiquitin ligasa Sce/dRING encargada de la mono-ubiquitinación de la histona H2A para promover represión génica (Cao et al., 2005; Gutierrez et al., 2012; Wang et al., 2004) (Figura 10). Se conoce que la falta de función de Sce afecta el desarrollo de los discos imaginales con determinados alelos que producen sobrecrecimientos en el disco de ojo (Classen et al., 2009), pero no en el disco de ala (Gutierrez et al., 2012). Por otro lado, dentro de los complejos trxG, entre otros, existe el complejo Bre1/Rad6 (Hwang et al., 2003). La proteína Bre1 es una E3-ubiquitin ligasa que

promueve la mono-ubiquitinación de la histona H2B (Henry et al., 2003; Hwang et al., 2003) a través de su interacción con la E2 Rad6 para promover los mecanismos de activación génica (Nakanishi et al., 2009) (Figura 10). De manera interesante, se sabe que tanto Sce (PRC1) como Bre1 (trxG) interaccionan con dRYBP, proteína del tipo ETP, promoviendo estados intermedios de represión y activación (Ferreles et al., 2014).

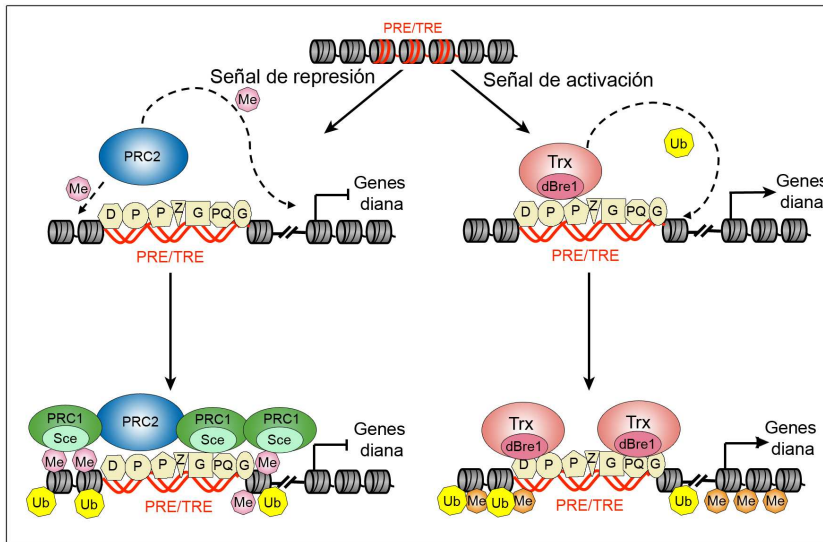


Figura 10: Mecanismos de acción de las proteínas PcG y trxG.

Las proteínas PcG y trxG son reclutadas a los PREs y TRES (Polycomb/trithorax Response Elements) de sus genes diana a través de las proteínas reclutadoras con capacidad de unión a ADN (en amarillo claro, D: DSP1, P: Polyhomeotic, Z: Zeste G: GAGA, PQ: Pisqueack). Ante una señal de represión, el PRC2 tri-metila a la histona

H3 en la lisina 27, marca que es reconocida por el PRC1, en el que Sce ubiquitina la histona H2A en la lisina 119. La acción coordinada del PRC2 y el PRC1 conlleva la represión de la transcripción de los genes diana. Ante una señal de activación, la proteína trithorax Bre1 ubiquitina a la histona H2B en la lisina 123, marca que sirve para reclutar otros complejos trithorax que di y tri-metilan la histona H3 en la lisina 4, para activar la transcripción de los genes dianas.

Al margen de sus funciones como factores epigenéticos dependientes de la transcripción, poco a poco se van descubriendo nuevas funciones independientes de transcripción de las proteínas PcG/trxG, como por ejemplo la ubiquitinación de proteínas para su degradación vía proteasoma. Este es el caso de Psc (Posterior Sex Combs), integrante del PRC1, que promueve la ubiquitinación de la Ciclina B para ser degradada vía proteasoma y promover así la progresión del ciclo celular (Mohd-Sarip et al., 2012). Otros ejemplos son la función de la proteína dRYBP en el control de la vía de IMD (del inglés, vía de la Inmunodeficiencia) para controlar la parada de la activación del sistema inmune (Aparicio et al., 2013) a través de la ubiquitinación y degradación vía proteasoma de Relish (Aparicio et al. en preparación) o dRYBP en el control de la apoptosis a través de su interacción con la E3 ligasa SKPA (Ferreles et al., 2013). También se han descubierto funciones independientes de la transcripción en humanos, como es el caso de RNF2/RING1B (homólogo de Sce) del complejo PRC1, el cual se ha propuesto que participa en el proceso de ubiquitinación de P53 vía proteasoma (Wen et al., 2014). También, se ha descrito un papel oncogénico para EZH2, componente del PRC2, activando al receptor de andrógenos (AR) en el cáncer de próstata (Xu et al., 2012). Finalmente, para SCML2 (homólogo de Scm), componente del PRC1, se ha descrito que coopera con el inhibidor de kinasas p21 para inactivar el complejo CYCE-CDK2 y controlar así la progresión G1-S del ciclo celular (Lecona et al., 2013).

En esta Tesis, se ha estudiado la función de las proteínas E3 ligasas, Sce/dRING1 del grupo PcG y dBre1 del grupo trxG, junto con su interactor dRYBP en el proceso de la apoptosis dependiente de *Dp53*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo de Tesis se ha empleado *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para estudiar los mecanismos mediados por microRNAs, factores de transcripción y factores epigenéticos, encargados de controlar la expresión génica y que están involucrados en el control del crecimiento y la muerte celular durante el desarrollo.

Los objetivos de esta Tesis han sido:

- 1) Análisis de la función del microRNA *miR-7* y sus genes diana en el desarrollo del ala.
- 2) Análisis de la función del microRNA *miR-306* y sus genes diana en el desarrollo del ala y del halterio.
- 3) Estudio de la función de *abrupt*, un gen regulado por *miR-306*, en el control del tamaño del ala y del halterio.
- 4) Análisis de la función de las proteínas Sce/dRING del grupo Polycomb (PcG) y dBre1 del grupo trithorax (trxG) en el control de la apoptosis dependiente de *Dp53* en el desarrollo del ala.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpe de moscas empleadas

Las estirpes de moscas que se han utilizado son las siguientes:

Las líneas de moscas conteniendo alelos mutantes: y^1w^{1118} , $Df(1)W^{67c23};lf/CyO;MKRS/TM6B$, $Df(1)W^{67c23};lf/CyO;G80^{ts}/TM2$ (descritas en www.flybase.org), $miR-7^{\Delta 1}/CyO-GFP$ (Li & Carthew, 2005), $Df(2R)exu^1/CyO-GFP$ (Hazelrigg et al., 1990), $y^1w^{1118}; Df(2R)exu^1,dRYBP^1/CyO$ (generada para este trabajo), $N^{55e11}/FM7$ (Kidd et al., 1983), ct^6 (Johnson & Judd, 1979), $dRYBP^1/CyO$ (Gonzalez et al., 2008), ab^1 (Morgan et al., 1925), ab^{clu1} (Vactor et al., 1993), $Df(1)w^{67c23};P\{EPgy2\}ab^{EY01129}$ (BDSC # 15833, Bellen et al., 2004), $miR-306-79-9b$ KO (Chen et al., 2014), $Ubx^{130}/TM6B$ (Kauffman, 1981), $pbx^1/TM6B$ y $bx^3/TM6B$ (Lewis, 1955), $E(spl)-C^{\Delta m6-m6}/TM6B$ (Bardin et al., 2010).

Líneas para inducir clones en los discos: $y^1w^{1118} hsFLP122; FRT^{G13}, UbiGFP$ y $FRT^{G13}, miR-7^{\Delta 1}$ (descritas en www.flybase.org).

Líneas conteniendo construcciones génicas: $P[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}$ (generada para este trabajo), $w^{1118}; PBac [ab-GFP.FLAG]$ (BDSC #38626, referida en el texto como *ab-GFP*), $p53R-GFP_{nls}$ (Wylie et al., 2014, referida en el texto como *P53-RE-GFP*), $p53-2XTY1-SGFP-V5-preTEV-BLRP-3XFLAG fTRG$ (VDRC #318453, Sarov et al., 2016, referida en el texto como *p53-GFP-FLAG*), $3'UTR-dRYBP-GFP$ (Tesis doctoral Ricardo Aparicio, 2012), $3'UTR-Ubx-GFP$ (Ronshaugen et al., 2005), $3'UTR-ab-GFP$ (Okamura et al., 2008), $PCNA-EmGFP$ (Swanhart et al., 2007), $w^{1118}; lf/CyO; P[Ubi-GFP.E2F1.1-230]P[Ubi-mRFP.CycB.1-266]/TM6B$ (BDSC #55099, (Zielke et al., 2014), referido en el texto como *Fly-fucci-ubiculo*), $dpp-LacZ^{BS3.0}$ (Blackman et al., 1991), ptc^{pyR68} (referida en el texto como *ptc-DsRed*) y hh^{pyR215} (referida en el texto como *hh-DsRed*) (Akimoto et al., 2005).

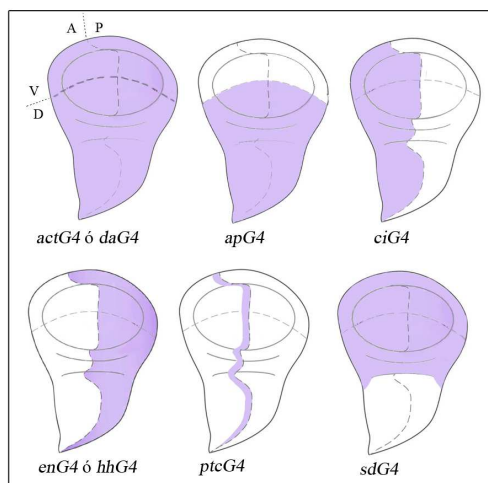


Figura 11: Representación esquemática de los dominios de expresión dirigidos por las líneas Gal4 en los discos imaginales de ala de tercer estadio.

Se muestran esquemas de discos en los que se indica en morado el dominio donde dirigen su expresión las líneas Gal4 empleadas en este trabajo. También se especifican los compartimentos del disco: A- anterior, P-posterior, D-dorsal y V-ventral.

Líneas conteniendo construcciones Gal4 (Figura 11): *engrailed Gal4* (*enG4*) (Brand & Perrimon, 1993), *scalloped Gal4* (*sdG4*) (Calleja et al., 1996), *cubitus interruptus Gal4* (*ciG4*), *patched Gal4* (*ptcG4*), *apterous Gal4* (*apG4*), *actina Gal4,UAS GFP* (*actG4,UAS GFP*), *daughterless Gal4* (*daG4*) y *hedgehog Gal4* (*hhG4*) (descritas en www.flybase.org).

Líneas conteniendo construcciones UAS: *UAS miR-7-140₁* (Li et al., 2009), *UAS miR-7-DsRed* (Stark et al., 2003), *UAS GFP-miR-306sp;UAS GFP-miR-306sp* (Eun et al., 2013), *UAS GFP-miR-306^{xc}* (Eun et al., 2013), *UAS miR-306-DsRed* (Aparicio et al. sin publicar), *UAS ab⁵⁵* (Cook et al., 2004), *UAS CycD,Cdk4* (Datar et al., 2000), *UAS CycE* (Richardson et al., 1995), *UAS dMyc* (BDSC# 9674), *UAS dRYBP* (Gonzalez & Busturia, 2009), *UAS Dp53* (full lenght), *UAS DΔNp53* (ambas líneas de Dichtel-Danjoy et al., 2013), *UAS Sce-FLAG* (Langlais et al., 2012), *UAS dBre1-GFP* (Bray et al., 2005), *UAS Ubx* (Castelli-Gair et al., 1994), *UAS DIAP1* (Hay et al., 1995), *UAS GFP*, *UAS LacZ*, (descritas en www.flybase.org). *UAS dap^{RNAi}* (TRiP line #HMS01610), *UAS Dp53^{RNAi}* (TRiP line #JF02513), *UAS ab^{RNAi}* (TRiP line #HMS00369), *UAS dBre1^{RNAi}* (TRiP lines #JF02853, JF01309, GL00368), *UAS bonus^{RNAi}* (TRiP line #HMS01657) *UAS Sce^{RNAi}* (VDRC #27465), *UAS dRYBP^{RNAi}* (Gonzalez et al., 2008), *UAS ph^{RNAi}* (VDRC #50028), *UAS Ubx^{RNAi}* (VDRC #37825) (Dietzl et al., 2007).

2. Obtención del cromosoma *Df(2R)exu¹,dRYBP/CyO* mediante recombinación

Para el estudio de las interacciones genéticas entre *dRYBP* y *miR-7* se requería la generación de un cromosoma recombinante conteniendo alelos mutantes para estos genes dado que ambos se localizan citogenéticamente en el cromosoma II (*dRYBP* en la región 58F7 y *miR-7* en la región 57A7). Se eligió generar el cromosoma *Df(2R)exu¹,dRYBP¹*. Para ello, se cruzaron moscas *y¹w¹¹¹⁸*; *dRYBP¹/CyO* con moscas *y¹w¹¹¹⁸*; *Df(2R)exu¹/CyO* y se seleccionaron hembras *y¹w¹¹¹⁸*; *dRYBP¹/Df(2R)exu¹* que se cruzaron con machos *y¹w¹¹¹⁸*; *Df(2R)exu¹/CyO*. Se seleccionaron machos o hembras con ojos de color rojo ya que la mutación *dRYBP¹* contiene un elemento *P[y⁺w⁺]* (Gonzalez et al., 2008), se cruzaron individualmente con moscas machos o hembras *y¹w¹¹¹⁸*; *Df(2R)exu¹/CyO*. Para obtener el stock con el cromosoma recombinante *y¹w¹¹¹⁸*; *Df(2R)exu¹,dRYBP¹/CyO* se observó la progenie de cada cruce individual, en el cual se confirmó la presencia de *Df(2R)exu¹* por la ausencia de moscas *CyO* de la progenie y se confirmó la presencia de *dRYBP¹* por el color de ojos rojos.

3. Generación de la construcción génica *p[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}* conteniendo la duplicación genómica de *miR-7*

Se amplificó un fragmento de 432 pb de la región 57A7 conteniendo la secuencia genómica del precursor de *miR-7* (Li & Carthew, 2005) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés PCR) empleando los primers 5'-GTCTAACCACCCATCCCCACAA-3' y 5'-ATGGGAGGGTACTGGGGAGTTC-3' (Invitrogen) y ADN genómico de *Drosophila*, cedido por el Dr. R. Aparicio, obtenido de moscas *y¹w¹¹¹⁸*. El tamaño del fragmento se comprobó mediante el análisis en gel de agarosa y posteriormente se clonó el fragmento en el vector pGEM-T easy (Promega #A1360) mediante la reacción de ligación con la T4 ADN ligasa (Roche #10481220001) para obtener el plásmido *pGEM-miR-7*. Para la clonación del fragmento de 432 pb en el vector *pCasper4 tub-eGFP*, que contiene el promotor de la *tubulina*, el gen *GFP* y el gen *white* (Brennecke et al., 2003) se hizo la digestión del plásmido *pGEM-miR-7* con la enzima de restricción *NotI* (Takara #1166A), se aisló el fragmento correspondiente a partir de un gel de agarosa empleando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, #28704), siguiendo las instrucciones del manual. A su vez, también se digirió el plásmido *pCasper4 tub-eGFP* con la enzima *NotI* y se des-fosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón (Roche #11758250001). La

reacción de ligación se llevó a cabo a 17°C durante un día con la T4 ADN ligasa (Roche). El producto de la ligación se introdujo en células competentes de *E.coli* DH5 α (Invitrogen, Servicio de Fermentación del CBMSO), mediante transformación estándar y a continuación, el cultivo se plaqueó en medio de agar sólido conteniendo Ampicilina a una concentración de 50 μ g/ml (Laboratorios Normon) por métodos estándar. Las colonias resultantes se crecieron y el ADN plasmídico se aisló siguiendo el protocolo estándar (Sambrook, 1989). Para confirmar la presencia del inserto de 432 pb y, por tanto, la obtención del plásmido *p[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}*, se empleó la enzima de restricción *EcoRI* (Takara #1040A). Para verificar la orientación del inserto, se mandó secuenciar en el servicio de secuenciación de ADN del Parque Científico de Madrid.

Para aislar el ADN de los geles se empleó el kit de extracción QIAquick Gel Extraction. Para obtener grandes cantidades de ADN plasmídico, se empleó el kit de Qiagen Pasmid Maxi (#12163).

4. Obtención de moscas transgénicas

Para la obtención de las moscas transgénicas conteniendo la construcción *p[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}* se siguieron los protocolos establecidos (Rubin & Spradling, 1982), utilizándose como huéspedes para el ADN foráneo embriones de la cepa *y¹Df(1)W^{67c23}* (www.flybase.org), que presentan una mutación en el gen *yellow* encargado de la coloración del cuerpo y además deleciona el gen *white* encargado de la coloración de los ojos. La concentración de ADN que se inyectó fue de 0,4 mg/ml junto con un plásmido denominado “helper” que contiene el ADN complementario que codifica para la transposasa a una concentración de 0,1 mg/ml. Las moscas resultantes de la inyección de embriones (llevada a cabo por el servicio de Transgénesis de *Drosophila* del CBMSO) se cruzaron individualmente con moscas *y¹Df(1)W^{67c23}* para la selección de individuos de ojos rojos que identifica a los individuos conteniendo la construcción génica *p[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}*. Para la localización cromosómica y generación de stocks de los transformantes resultantes se empleó el stock *y¹Df(1)W^{67c23}; If/CyO; MKRS/TM6B*.

5. Sistema Gal4/UAS

Se empleó el sistema Gal4/UAS (Brand & Perrimon, 1993) para los experimentos de sobre-expresión génica e inactivación de genes mediante ARN interferentes. Este sistema permite controlar espacio-temporalmente la expresión de un gen determinado mediante el uso de una gran variedad de líneas de moscas transgénicas que contienen la proteína Gal4 y cuya expresión está dirigida por elementos cis-reguladores específicos que controlan su expresión temporal y/o espacialmente. La expresión de la proteína Gal4 es dependiente de temperatura permitiéndose así alcanzar distintos niveles de sobre-expresión o de inactivación génica. En los experimentos realizados durante esta Tesis, la progenie de los cruces se desarrolló a 17°C, 25°C o 29°C según los requerimientos experimentales. En los casos en los que la expresión génica resultaba letal se empleó la proteína Gal80^{ts} en conjunción con la proteína Gal4 ya que la proteína Gal80^{ts} es un inhibidor de la proteína Gal4 que se expresa a 17°C. Para modular la acción de la proteína Gal80^{ts}, los cruces de moscas conteniendo Gal80^{ts} y Gal4, se mantuvieron a 17°C (temperatura a la que Gal80^{ts} inhibe la activación de Gal4) hasta que la descendencia alcanzó el segundo estadio larvario temprano, momento en el que se pasaron a 29°C (a esta temperatura el Gal80 no se expresa y, por tanto, se activa el Gal4) (Figura 12).

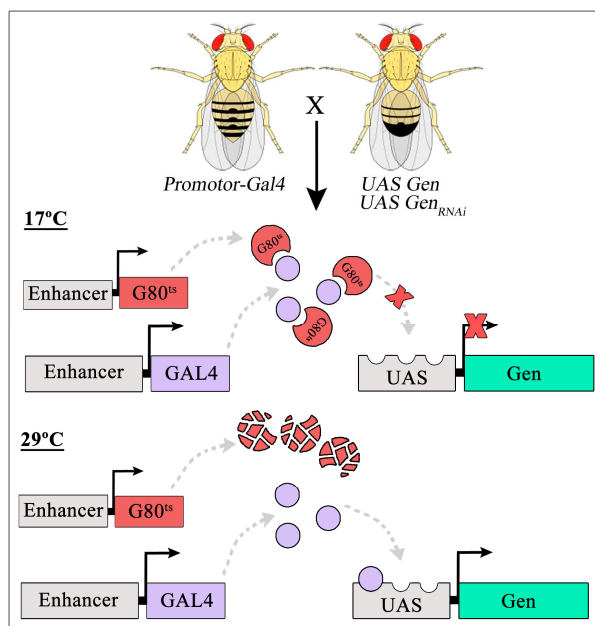


Figura 12: El sistema Gal4/UAS.

La expresión espacio-temporal de la proteína Gal4 es eficiente a 29°C y viene determinada por el promotor o enhancer de elección que al unirse a las secuencias UAS (Upstream Activator Sequences) promueve la expresión del gen de interés o su inactivación mediante el uso de líneas conteniendo el ARN interferente (RNAi). La proteína Gal80 termosensible (G80^{TS}) inhibe la expresión de la proteína GAL4 a temperaturas menores de 29°C, a la cual la proteína G80^{TS} se degrada, permitiendo que Gal4 pueda ejercer su función.

6. Medios de cultivo para las moscas

Los stocks y cruces experimentales de moscas se mantuvieron en tubos de papilla estándar provistos por el servicio de cultivos de moscas del CBMSO conteniendo lo siguiente:

Papilla para moscas (20 l)	
Agua	9 l + 2 l (al final cuando se enfríe)
Glucosa	1 Kg disuelto en 2 l de agua
Agar	157g disuelto en 2 l de agua
Harina	700 g disuelto en 2 l de agua
Levadura	2 Kg disuelto en 3 l de agua
Nipagín	60 ml
Ácido propiónico	85 ml

En aquellos experimentos en los que era preciso la selección de larvas de tercer estadio de desarrollo, los cruces fueron mantenidos en medios de cultivo conteniendo azul de bromofenol (Sigma) al 5% (denominada como papilla azul). Las larvas que están al final del tercer estadio larvario dejan de alimentarse y comienzan a trepar por el tubo, de este modo, el aparato digestivo, a diferencia del resto de estadios larvarios, deja de presentar una coloración azul. Para los estudios de letalidad se emplearon placas de cultivo denominadas placas de puesta, generadas por el servicio de cultivos de moscas conteniendo lo siguiente:

Papilla placas de puesta (1 l)	
Agar	23 g
Glucosa	75 g
Mosto tinto	500 ml
Agua	500 ml
Ácido propiónico	4 ml

Se calienta hasta su disolución durante 20 minutos y después se deja enfriar hasta los 60°C, para añadir el ácido propiónico.

7. Inmunohistoquímica

A continuación se exponen las composiciones de las principales soluciones empleadas para los experimentos de inmunohistoquímica.

Buffered Phosphate Saline (PBS a pH=7,4)
137 mM de NaCl
2,7 mM KCl
10 mM NaHPO ₄ · 2H ₂ O
2mM K ₂ HPO ₄

PBT
PBS 1x
0,3% de Tritón X-100 (Roche #10789704001)

PBT-BSA
PBS 1x
0,3% de Tritón X-100
0,5% de Suero de Albúmina Bovina (BSA) (Sigma #A7904)

7.1 Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia

Los discos imaginales se diseccionaron en PBS y se fijaron durante 30 min a temperatura ambiente (aprox. 22°C) y en agitación en 200 µl de una solución de PBS conteniendo paraformaldehído (PFA) al 4%, 2 µl de Tritón X-100 al 10% y 2 µl de Dioxicolato (DOC) al 10%.

Tras fijar los discos, se hicieron dos lavados con PBT de 10 min cada uno en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los discos con la solución de bloqueo PBT-BSA durante 30 min también en agitación a temperatura ambiente. Después, los discos se incubaron con los anticuerpos primarios a la dilución que se especifica en la Tabla MM 1 en PBT-BSA en agitación o bien durante 2h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C. Pasado este período de incubación con el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 15 min cada uno con PBT-BSA y se procedió a incubar los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos a la dilución especificada en la Tabla MM 1 en PBT-BSA durante una hora a temperatura ambiente. El montaje de las muestras se realizó en Vectashield H-1000 (Vector labs) o Dako Medium (Dako North America #S3023).

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Dilución	Especie	Referencia/Cedido por
Abrupt	1:200	Conejo	(Hu et al., 1995)/ Stephen Crews
Caspasa-3 (C3)	1:50	Conejo	Cell Signaling Technologies (#9661)
Cut (2B10)	1:20	Ratón	Iowa Hybridoma Bank
Flag	1:500	Ratón	Sigma (#F3165)
GFP	1:300	Conejo	Invitrogen (#A-6455)
P53-7A4	1:20	Ratón	Iowa Hybridoma Bank
P53-H1S	1:20	Ratón	Iowa Hybridoma Bank
PH3	1:200	Conejo	Upstate Technologies Inc (#06-570)
Senseless	1:100	Cobaya	(Nolo et al., 2000)/Hugo J. Bellen
Sce	1:50	Conejo	(Lagarou et al., 2008)/ Peter Verrijzer
Ubx	1:20	Ratón	Iowa Hybridoma Bank
Anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos			
Alexa 488 (anti-ratón)	1:500	Burro	Invitrogen (Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO)
Alexa 488 (anti-conejo)		Burro	
Alexa 555 (anti-ratón)		Burro	
Alexa 555 (anti-conejo)		Burro	
Alexa 555 (anti-cobaya)		Cabra	
Alexa 647 (anti-ratón)		Burro	
Alexa 647 (anti-conejo)		Burro	

Tabla MM 1 : Lista de anticuerpos primarios y secundarios acoplados a fluoróforos.

7.1.a Tinción con To-PRO3

Se empleó To-PRO3 (Invitrogen #T3605) como marcador nuclear en los discos. Para ello, tras completar el protocolo de inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia, se incubaron los discos en una dilución 1:500 en solución de bloqueo durante 10 min.

7.2 Inmunohistoquímica para microscopía visible

Complejo Avidina+Biotina acoplados a peroxidasa (ABC)	
490 µl de PBS	
5 µl de Avidina	Vector Labs
5 µl de Biotina	

Solución de revelado para inmunohistoquímica en visible
250 µl de Diaminobencidina (DAB) (20 mg/ml)
250 µl de PBS

Los discos se diseccionaron, fijaron e incubaron con los anticuerpos primarios siguiendo el mismo método que para inmunohistoquímica de fluorescencia. Transcurrido el tiempo de incubación de los anticuerpos primarios correspondientes de la Tabla MM 1, se hicieron 3

lavados de 15 min con la solución de bloqueo. A continuación, se incubaron los discos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la Biotina (Tabla MM 2). Durante este tiempo de lavados, se preparó el Complejo Avidina+Biotina (ABC) durante 30 min en agitación. Seguidamente, se lavaron los discos 3 veces con PBT durante 10 min y se incubaron con el complejo ABC durante 30 min. Tras esta incubación, se lavaron los discos 3 veces con PBT durante 10 min. Posteriormente y una vez lavadas las muestras, se transfirieron a un pocillo donde se añadió 500 µl de la solución de revelado y se inició la reacción al añadir 1 µl de H₂O₂ al 3%. Se dejó desarrollar la tinción hasta detectar coloración marrón. Para detener la reacción se añadió PBS. Los discos fueron montados en Glicerol al 90%.

Anticuerpos secundarios biotinilados			
Anticuerpo	Dilución	Especie	Referencia
Ratón-Biot	1:200	Conejo	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc
Conejo-Biot		Ratón	

Tabla MM 2: Tabla de anticuerpos secundarios biotinilados.

8. Preparación histológica de alas y halterios

Para la preparación de las alas, al estar guardadas en la solución 3 EtOH: 1 Glicerol, se diseccionaron en la misma solución y a continuación, se deshidrataron en etanol absoluto (Merck #1409831000). Se realizó el montaje de al menos 20 alas en Euparal (AnSCO Laboratories). Los halterios se diseccionaron en 3 EtOH: 1 Glicerol y se montaron en glicerol al 90% (Sigma #G5516).

9. Citometría de flujo

Medio de cultivo de Schneider M3 (1 l)	
450 ml de Shields and Sang M3 insect medium	Sigma #S3652
50 ml Suero Fetal Bovino (FBS)	Sigma #9665
5 ml de Penicilina - Estreptomicina	Gibco #15070-063
20 mg/ml insulina	Sigma #I6634
Esterilizar con filtros de 0,2 µm	

PBS –FBS (500 µl)
490 µl de PBS 1x
5 µl de FBS

Para analizar el tamaño y el perfil del ciclo celular de las células de los discos imaginales de ala se empleó un FACS Canto II Becton Dickinson (Servicio de Citometría de Flujo del CBMSO).

Para el análisis del tamaño celular se diseccionaron 10 discos de cada genotipo en medio de cultivo M3 en hielo, en el caso del análisis de ciclo celular, se diseccionaron 60 discos por genotipo. A continuación, los discos imaginales se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm, se retiró el M3 y finalmente se incubaron en 300 µl de Tripsina-EDTA (Sigma #T4299) y 0,5 µl de Hoechst 33342 (Molecular Probes #H3570) durante 35 min a 28°C en agitación. Posteriormente, se añadió la solución de Tripsina + Hoechst y se pipeteó alrededor de 10 veces para facilitar el disgregamiento de las células de los discos. Una vez disgregadas, se añadieron

200 µl de PBS-FBS y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se re-suspendieron las células en 300 µl de PBS-FBS. Cada genotipo se analizó con tres muestras biológicas diferentes de manera independiente. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo 7.5.

10. Hibridación *in situ*

A continuación se exponen las soluciones empleadas para este protocolo.

PBS-Tween 20 (PBTW, no confundir con PBT)
PBS 1x
0,1% Tween20 (Merck 8221841000)

Solución de Hibridación (SH)	Para preparar 5 ml
50% de Formamida (Invitrogen #15515-026)	2,5 ml
5x SSC (NaCl + Citrato de Sodio a pH = 7)	1,25 ml
5mM EDTA (Merck #1084180250)	50 µl
50 µg/ml Heparina	5 µl
0,1% Tween 20	50 µl
5 µg/ml DNA blocking Oligo (Sigma) 5'GGAATTCGGAAGAGGACCAACTGTCACC-3'	25 µl
Ácido cítrico (Sigma #C1857)	46 µl
Agua DEPC	0,92 ml

Buffer AP	Para preparar 50 ml
100 mM de Tris pH= 9,5	5 ml
50 mM de MgCl ₂	2,5 ml
100 mM NaCl	1 ml

Las soluciones necesarias para este protocolo fueron preparadas con agua destilada tratada con DEPC (Diethyl Pirocarbonato, un inhibidor de ARNasas, Sigma #D5758). La hibridación *in situ* se realizó con la sonda LNA específica para hsa-*miR-7* 5'-ACAACAAAATCACTAGTCTTCCA-3' (Exiqon #38485-01). Se diseccionaron las larvas de tercer estadio en PBS y se incubaron en PBS-PFA durante 20 min. Seguidamente, se volvieron a incubar durante 15 min en PBT-PFA y se lavaron tres veces en PBT durante 5 min cada lavado. Posteriormente se incubaron los discos con Proteinasa K durante 1 min en agitación, tras lo cual se lavaron los discos 2 veces con PBTW + Glicina (2mg/ml, Merck #5001901000) durante 2 min y dos veces más durante 5 min con PBTW. Tras los lavados, los discos se incubaron durante 20 min en PBS-PFA y se lavaron tres veces durante 5 min con PBTW. Después, se lavaron en una solución 1:1 PBTW:Solución de Hibridación (SH) durante 5 min y más tarde en SH durante otros 5 min. Los discos se pre-hibridaron en SH durante 1h a la temperatura de hibridación (48°C para esta sonda). Pasado este tiempo de pre-hibridación, los discos imaginales se incubaron con la sonda LNA *miR-7* diluida 1:100 en SH durante toda la noche a 48°C. Al día siguiente, se eliminó la sonda y los discos fueron lavados con SH durante 20 min a 48°C. Seguidamente fueron lavados con diluciones secuenciales de SH:PBTW (3:1, 1:1, 1:3), cada una durante 10 min a 48°C. Se

continuó lavando los discos cinco veces con PBTW durante 20 min a 48°C y se incubó con el anticuerpo secundario anti-Digoxigenina (Roche #1175041, previamente fue pre-absorbido en embriones) a una dilución 1:1000 en PBTW durante 2h a temperatura ambiente. Tras esto, se lavaron los discos cuatro veces durante 10 min en PBTW y dos veces en Buffer AP (del inglés, Alkaline Phosphatase) durante 5 min. Seguidamente, se incubaron los discos en 1 ml de buffer AP conteniendo 20 µl de NBT/BCIP (Thermo Scientific #34042). Una vez desarrollada la tinción (alrededor de 15 h) se lavaron los discos dos veces en PBS durante 10 min y se fijaron durante 10 min en PBT-PFA. Finalmente, se lavaron en PBS y se montaron en Glicerol al 90%.

11. Inducción y análisis de los clones deficientes para *miR-7*

Para inducir los clones deficientes para *miR-7* se cruzaron hembras $y^1w^{118} hsFLP122; FRT^{G13}, UbiGFP$ con machos $FRT^{G13}, miR-7^{A1}$, de modo que, la progenie de las células en las que ocurre la recombinación quedan marcados unos por la ausencia de GFP y otros por la expresión doble de GFP. De este modo, según los stock empleados en este experimento, los clones deficientes para *miR-7* están marcados por la ausencia de GFP, mientras que los clones gemelos con niveles de *miR-7* iguales a la condición salvaje, están marcados con dos dosis de GFP. El resto de células en las que no ha ocurrido la recombinación presentan una única dosis de GFP.

Las larvas de 24-48h progenies del cruce se sometieron a un choque térmico a 37°C durante 1 h. Después, se dejaron desarrollar hasta tercer estadio larvario, momento en el que fueron diseccionadas y fijadas según los protocolos descritos. Para el análisis del tamaño de los clones se utilizó el programa FIJI y se midieron las áreas de cada clon y su clon gemelo. En total se analizaron 25 clones en distintos discos.

12. Medición del tamaño de las alas y validación del criterio de clasificación del tamaño

Para la medición del tamaño de las alas, se midió el contorno de al menos 20 alas de cada genotipo. Se empleó el programa FIJI que calcula las áreas de los contornos marcados. Para la clasificación de las alas $Df(2R)exu^1/miR-7^{A1}$ y debido a la variabilidad de los tamaños de las mismas, se analizaron las áreas de 40 alas y se dividieron en tres grupos (de manera independiente por tres investigadores distintos) en función de la reducción del tamaño que presentaban respecto a las alas salvajes. En la Clase 1 se incluyeron las alas con una reducción del 55-65%, en la Clase 2 presentaban una reducción del 45-55% y en la Clase 3 tenían una reducción de 35-45%.

Como control, para asegurar que seguían el mismo esquema todas las alas analizadas bajo este criterio de clasificación (apartado 1.1.c de Resultados), se hizo un análisis estadístico de todas las Clases 1 de los genotipos analizados entre sí, las Clases 2 entre sí y los genotipos de las Clases 3 entre sí. De este modo, siguiendo el criterio de clasificación por rangos de tamaños, no debería haber diferencias estadísticas significativas entre las mismas clases de los distintos genotipos. Como se puede observar en la Figura 21 todos los genotipos de la misma clase no presentan diferencias significativas, apoyando el criterio de clasificación.

13. Medida de la densidad de tricomas y análisis de la intensidad de fluorescencia de los discos imaginales

La cuantificación de densidad de tricomas se realizó siempre eligiendo la misma región de interés determinada en FIJI (ROI del inglés, Región of Interest) entre las venas L3 y L4, enfocando la vena L3 (que corresponde con la región dorsal del ala, Milan et al., 2001). Dado que en el ala un tricoma corresponde a una única célula (Robertson, 1959), se contó el número de tricomas por la misma unidad de área de al menos 20 alas del mismo genotipo.

Para la cuantificación de los niveles de fluorescencia de los discos imaginales, se midió la intensidad de fluorescencia y se normalizó dicha medida respecto al tamaño, habitualmente del “wing pouch” debido al empleo de la línea *scalloped* (en caso contrario se especifica en el texto). De esta manera, los datos de intensidad de fluorescencia presentados en las gráficas de este trabajo, corresponden a la relación de Fluorescencia/Área. Para cada genotipo, generalmente se obtuvieron imágenes de al menos 10-20 discos imaginales que fueron fotografiados al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

14. Irradiación de larvas con rayos-X

Larvas de tercer estadio larvario fueron irradiadas a una dosis de 4000 Rads empleando un instrumento de Rayos-X MG-102 de Philips. En este trabajo, las larvas se desarrollaron a 29°C debido al empleo del sistema Gal4/UAS. Generalmente, antes de la irradiación se seleccionaron las larvas experimentales y las larvas control por la ausencia o presencia de marcadores fluorescentes como GFP. Tras la irradiación, las larvas fueron devueltas a 29°C durante un período de 4,5h de recuperación, tras el cual fueron diseccionadas para realizar tinciones inmunohistoquímicas de los discos imaginales según el protocolo detallado anteriormente.

15. Obtención y procesamiento de imágenes

Para la obtención de imágenes de moscas, se empleó una lupa MZ6 (Leica) acoplada a una cámara réflex EOS 450D (Canon). Para la obtención de imágenes de embriones, discos imaginales y cutículas adultas por microscopía óptica se empleó un microscopio vertical Axioskop2 Plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color. En el caso de las imágenes por microscopía de fluorescencia, se emplearon los microscopios de Barrido Láser confocales LM510 Vertical e Invertido (ambos de Zeiss). El procesamiento de las imágenes fue llevado a cabo con los programas FIJI y Photoshop CS5.

16. Estudio de la letalidad durante el desarrollo

Para analizar el estadio de desarrollo en el cual se produce la letalidad de los individuos $miR-7^{A1}/miR-7^{A1}$ y $Df(2R)exu^1/miR-7^{A1}$, se emplearon los stocks $miR-7^{A1}/CyOGFP$ y $Df(2R)exu^1/CyOGFP$ que facilitan la distinción de individuos homocigóticos o doble heterocigóticos debido a la falta de expresión de GFP. Se cruzaron hembras o machos $miR-7^{A1}/CyOGFP$ con los correspondientes machos o hembras $miR-7^{A1}/CyOGFP$. De la misma forma se cruzaron hembras o machos $Df(2R)exu^1/CyOGFP$ con machos o hembras $miR-7^{A1}/CyOGFP$. Se seleccionaron los embriones por ausencia de GFP, se contaron y se pusieron en placas o tubos de papilla para seguir su desarrollo y separarlos del resto de los individuos para evitar

competición. Se dejaron desarrollar los embriones y se fue cuantificando el número de individuos por estadio: embrionario, larvario o adulto. La cuantificación se hizo con 609 embriones homocigotos para *miR-7^{A1}* y con 113 embriones doble heterocigotos para *Df(2R)exu¹/miR-7^{A1}*.

17. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa Graphpad Prism empleando el t-test para pares de muestras con o sin corrección de Welch en función del requerimiento del experimento (varianzas desiguales). Cuando se compararon más de dos muestras, se empleó el test one-way ANOVA con el post-test de Tukey para comparar las columnas por pares. Los datos están representados como media + SEM (Error estándar de la media). La significancia estadística está representada en los gráficos de la siguiente manera: n.s.: no significativo ($p > 0,05$), * $0,01 < p < 0,05$, ** $0,001 < p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Función de los microRNAs en la regulación génica que controla el crecimiento del ala de *Drosophila*

1.1 Análisis de la función del microRNA *miR-7* en el desarrollo del ala

1.1.a *miR-7* se expresa en el disco imaginal de ala

miR-7 se encuentra localizado en el brazo derecho del cromosoma II (Figura 13), en una región intrónica del gen *bancal* (*bl*) (Li & Carthew, 2005).

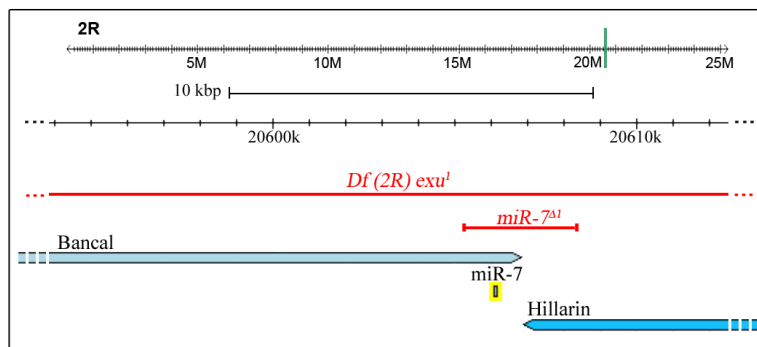


Figura 13: Localización genómica del microRNA *miR-7*.

miR-7 está compuesto por 432 pb y se encuentra localizado citogenéticamente en la región 57A7 del cromosoma 2R, en una región intrónica del gen *bancal*. En rojo se representan las regiones que se eliminan en las mutaciones *Df(2R)exu1* y *miR-7^{Δ1}*.

Se estudió la expresión de *miR-7* en los discos de ala mediante experimentos de hibridación *in situ* usando la sonda hsa-*miR-7*, una sonda LNA (Locked Nucleic Acid) generada específicamente para *miR-7* (Exiqon, Materiales y Métodos), que previamente había sido empleada para detectar la expresión de *miR-7* en el disco de ojo (Li & Carthew, 2005). En primer lugar, se comprobó la especificidad de la sonda analizando la expresión de *miR-7* en discos de ala conteniendo tanto altos como bajos niveles de *miR-7*. Para ello, se sobre-expresó *miR-7* utilizando la línea *patched Gal4* (*ptcG4*) la cual dirige la expresión en una franja de células inmediatamente anteriores a lo largo de todo el borde Antero-Posterior (A/P) del disco imaginal de ala (Figura 11) y la línea *UAS miR-7-DsRed* (Stark et al., 2003) que permite sobre-expresar *miR-7* y detectar la eficacia de la sobre-expresión mediante la detección de *DsRed*. Como se observa en la Figura 14A se detecta en los discos *ptcG4/+; UAS miR-7-DsRed/+* una señal más fuerte en el dominio de expresión dirigido por la línea *ptcG4*, indicando por tanto que la sonda es capaz de detectar los altos niveles de expresión de *miR-7*. También se analizó la expresión de *miR-7* en discos imaginales *Df(2R)exu1/miR-7^{Δ1}*, combinación alélica que elimina la función de *miR-7* (Figura 13) y cuya descripción se detalla más adelante (Figura 17). Como se puede observar en la Figura 14B, no se detecta señal de la sonda en los discos *Df(2R)exu1/miR-7^{Δ1}*. Estos resultados validan el uso de la sonda hsa-*miR-7* para detectar la expresión de *miR-7* en el disco imaginal de ala.

También, se analizó la expresión de *miR-7* en discos de ala salvajes y se observó que su expresión es débil pero ubicua en todo el disco (Figura 14C), excepto en la región del borde Dorso-Ventral (D/V) donde se detecta una expresión diferencial en los grupos de células que

componen esta región (Figura 14D). Como se expone en el apartado 3.1 de la Introducción, el borde D/V está compuesto por las “boundary cells”, células que forman el borde propiamente dicho, y las “non-boundary cells”, células adyacentes al borde tanto dorsales como ventrales. El análisis detallado de la expresión de *miR-7* indicó que *miR-7* se expresa más fuerte en las “non-boundary cells”. Sin embargo en las “boundary cells” o bien no se expresa o se expresa de manera muy débil (Aparicio et al., 2015).

Este patrón de expresión de *miR-7* sugiere que este microRNA podría estar regulando el desarrollo del ala a través de la regulación de sus genes diana en el borde D/V del disco.

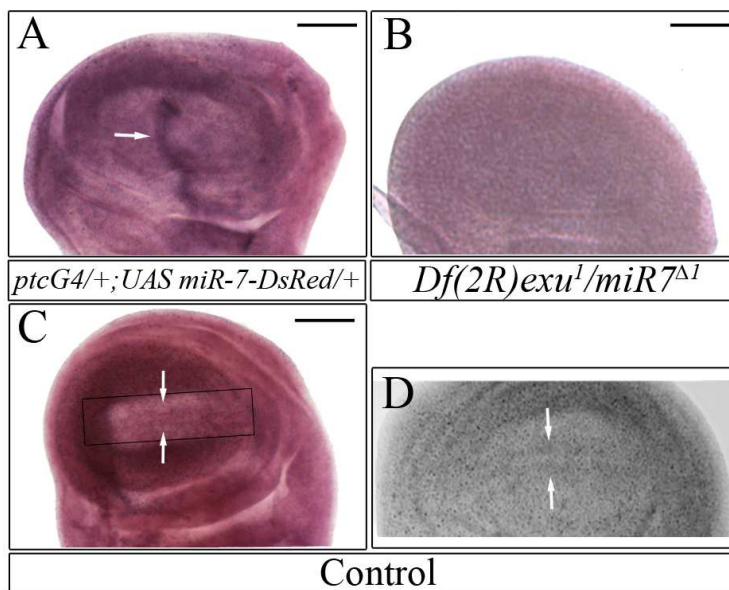


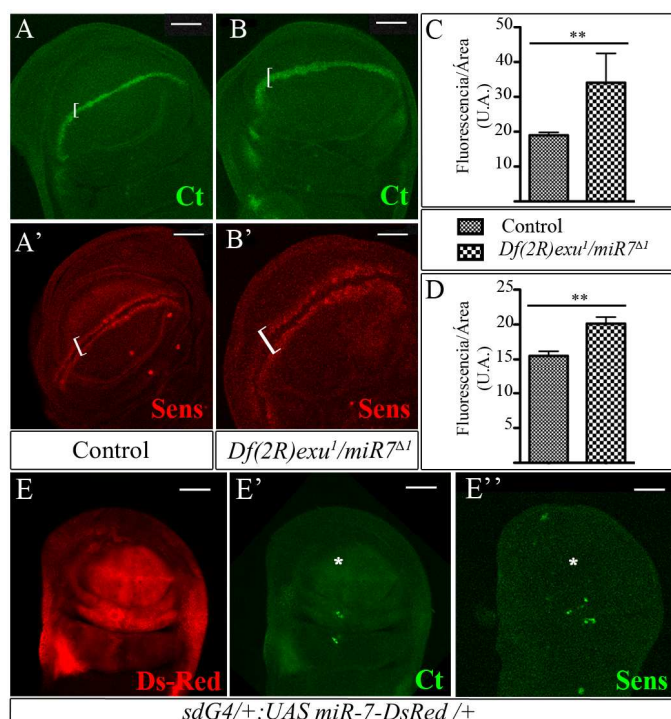
Figura 14: Detección de la sonda de *miR-7* mediante hibridación *in situ*.

A) Disco imaginal de ala *ptcG4/+; UAS miR-7-DsRed/+*. Se aprecia una fuerte expresión de la sonda de *miR-7* (flecha blanca) en la región del dominio de expresión de *ptcG4*, donde se sobre-expresa *miR-7*. **B)** Disco *Df(2R)exu1/miR7^{Δ1}*. No se observa expresión de la sonda debido a la falta de *miR-7*. **C)** Discos control de moscas *y1w¹¹¹⁸* donde se aprecia la expresión salvaje de la sonda de *miR-7* en la región del borde D/V (flechas blancas). **D)** Ampliación de la región del D/V del

disco control donde se observa una expresión diferencial dentro de las células del borde. En A, B y C se muestra la región del “wing pouch” del disco. Las barras de calibración representan 50 μ m.

1.1.b La modulación de los niveles de *miR-7* afecta la expresión de *Cut* y *Senseless*

Sabiendo que *miR-7* se expresa en la región del borde D/V y que su expresión se detecta en las células adyacentes al borde D/V, es decir, en las “non-boundary cells”, se decidió continuar analizando si la modulación de los niveles de *miR-7* tiene efecto en la expresión de los genes instructores de la formación del borde D/V. Para ello, se analizó la expresión de *Cut* (Ct), como reportero de la vía de Notch en las células del borde (Blochliger et al., 1988) y de *Senseless* (Sens) como reportero de la activación de la vía de Wingless en las células adyacentes del borde (Jafar-Nejad et al., 2006; Neumann & Cohen, 1997). Dado que la expresión de estos marcadores varía a lo largo del crecimiento del disco imaginal, en estos experimentos, las larvas de los distintos genotipos fueron crecidas en “papilla azul” (Materiales y Métodos) para controlar que los discos diseccionados correspondían al tercer estadio larvario y, por tanto, la tinción con los anticuerpos se realizaba en el mismo marco temporal de desarrollo. En primer lugar, se observó que en los discos *Df(2R)exu1/miR7^{Δ1}*, deficientes para *miR-7* muestran un aumento significativo de expresión de ambos marcadores, Ct y Sens, en las respectivas células del borde D/V al comparar la expresión de estos marcadores en discos salvajes (Figura 15A-D). Por otro lado, la sobre-expresión de *miR-7* en discos de ala *sdG4/+; UAS miR-7-DsRed/+* induce la represión de la expresión de Ct y de Sens en las respectivas células del borde (Figura 15E-E’).



fluorescencia medida en el área donde se expresa Cut en el borde D/V. (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=13 discos para cada genotipo). **D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida en el área donde se expresa Senseless en el borde D/V. (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=13 discos para cada genotipo). **(E-E'')** Discos imaginales de ala $sdG4/+; UAS miR-7-DsRed/+$. **E)** Expresión de DsRed (rojo) en el dominio de $sdG4$ en la región del "wing pouch" del disco. **E')** Expresión de Cut (Ct, verde) en el "wing pouch". Nótese la ausencia de expresión en la región del borde D/V (asterisco). **E'')** Expresión de Senseless (Sens, verde) en el "wing pouch". Nótese la ausencia de expresión en la región del borde D/V (asterisco). Las barras de calibración representan 50 μm . ** 0,001 < p < 0,01.

Estos resultados indican que la modulación de los niveles de expresión de *miR-7* tienen un efecto en las vías de señalización de Notch y de Wingless, las cuales se sabe que tienen un papel en el control del crecimiento del disco (Baker, 2007; Herranz & Milan, 2008; Herranz et al., 2008).

1.1.c Función de *miR-7* en el control del tamaño del ala

Para estudiar el papel de *miR-7* durante el desarrollo del ala de *Drosophila* se analizó el fenotipo asociado a la falta de función de *miR-7*. Para ello, se hizo uso de moscas $miR-7^{\Delta 1}$ (Li & Carthew, 2005). $miR-7^{\Delta 1}$ es una deficiencia genómica de 6,8 Kb que elimina el locus de *miR-7* además de regiones de los dos genes adyacentes, en concreto: los dos últimos exones de *bancal* y los dos primeros de *Hillarín* (Li & Carthew, 2005), Figura 13). Se estudió la viabilidad de los individuos $miR-7^{\Delta 1}$ homocigóticos analizando la progenie del stock $miR-7^{\Delta 1}/CyO-GFP$. Se seleccionaron embriones $miR-7^{\Delta 1}$ homocigóticos por la ausencia de GFP y se observó que tan solo un 19% de los embriones llegaban a estadio larvario y, de estas larvas, ninguna alcanzaba la fase de pupación (Figura 16A). Los embriones y larvas $miR-7^{\Delta 1}/miR-7^{\Delta 1}$ analizados presentaban defectos morfológicos en la región anterior, en el cierre dorso-ventral y en el patrón de los denticulos ventrales (Figura 16A'-A''). Debido a la imposibilidad de poder estudiar los fenotipos en discos y alas adultas con los mutantes $miR-7^{\Delta 1}$ homocigóticos, se decidió combinar $miR-7^{\Delta 1}$ con la deficiencia $Df(2R)exu^1$ (Hazelrigg et al., 1990), que además de otros genes, elimina la región genómica que contiene a *miR-7* (Figura 13). Se analizó la viabilidad de los individuos $Df(2R)exu^1/miR-7^{\Delta 1}$ resultantes del cruce de machos $miR-7^{\Delta 1}/CyO-$

GFP con hembras *Df(2R)exu¹/CyO-GFP*. Se observó que el 30% de los individuos *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* alcanzaba el tercer estadio larvario y que un 13% de los individuos *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* llegaban a la etapa adulta (Figura 16B). Estas moscas presentaban una severa disminución del tamaño del ala (Figura 16B'). Estos resultados indican que *miR-7* es necesario para el desarrollo de *Drosophila* y su falta produce letalidad en distintos estadios del desarrollo. Además, estos resultados muestran que *miR-7* es necesario para el desarrollo del ala de *Drosophila*.

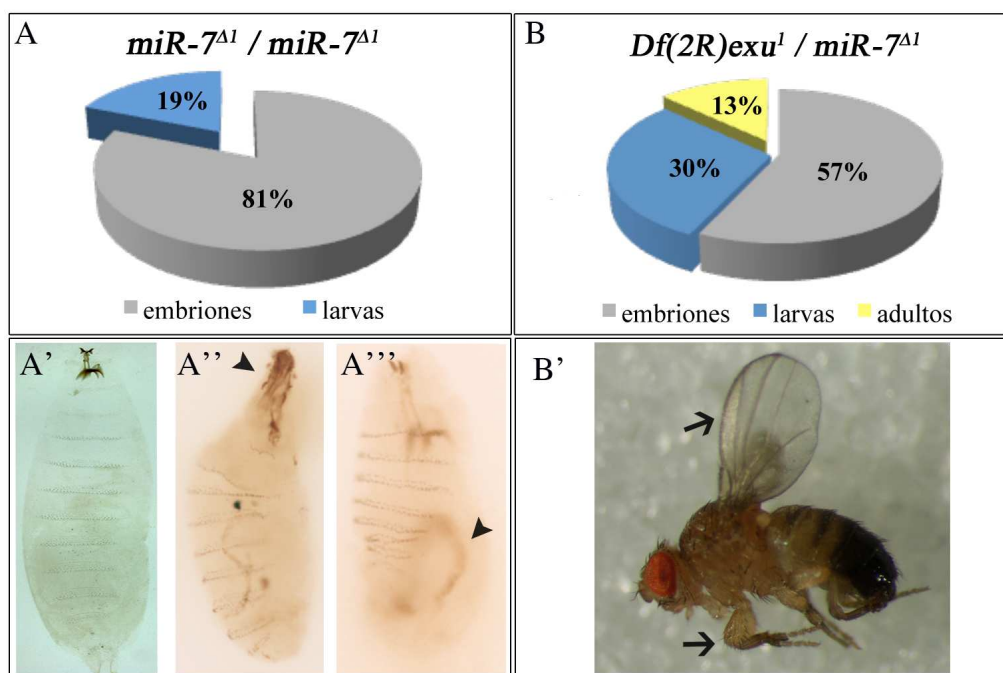


Figura 16: Análisis de la viabilidad de los individuos deficientes para *miR-7* a lo largo del desarrollo.

A) Gráfica circular de la viabilidad de los mutantes *miR-7^{Δ1}/miR-7^{Δ1}* en cada estadio del desarrollo (n=609 embriones). **A')** Embrión salvaje. **A''-A'''**) Embriones *miR-7^{Δ1}/miR-7^{Δ1}* donde se aprecian defectos morfológicos en la región anterior (cabeza flecha en A'') y en el cierre dorso-ventral (cabeza flecha en A'''). **B)** Gráfica circular de la viabilidad de los mutantes *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* en cada estadio del desarrollo (n=113 embriones). **B')** Mosca *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* donde se aprecia la reducción del tamaño de las alas y las patas (flechas).

Se decidió analizar la función de *miR-7* en el control del tamaño del ala. Se observó que el tamaño de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* presenta variabilidad. Se estudió dicha variabilidad y se observó que la reducción del tamaño del ala oscila entre un 65% y un 35% respecto al tamaño de las alas salvajes. Para el estudio de la función de *miR-7* en el control del tamaño del ala, se clasificaron las alas de moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* en tres clases según la reducción de tamaño que presentaban respecto al tamaño de las alas salvajes (Materiales y Métodos) (Figura 17A-B''). La Clase 1 incluye alas que presentan una reducción del 55-65%. La Clase 2 incluye alas que muestran una reducción del 45-55% y, por último, la Clase 3 incluye alas con una reducción del 35-45% (Figura 17C). La frecuencia de cada una de las clases en las moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* resultó ser Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5% (Figura 17K).

Una vez concluido que la falta de función de *miR-7* producía una reducción del tamaño del ala, era importante determinar si dicha reducción no estaba directamente asociada a las mutaciones utilizadas en este estudio, en particular la combinación alélica *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*.

Para ello, se realizaron dos tipos de experimentos de rescate de los fenotipos observados en las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*.

Por un lado, se empleó la línea *UAS miR-7-DsRed* que permite la sobre-expresión de *miR-7* (Lai et al., 2005; Stark et al., 2003) y la línea *scalloped Gal4 (sdG4)* la cual dirige la expresión en el “wing pouch” del disco imaginal de ala, región que dará lugar al ala propiamente dicha del individuo adulto (Figura 11). Se observó que las alas de las moscas *sdG4/+; UAS miR-7-DsRed/+* desarrolladas a 17°C presentaban varios fenotipos: 1) muescas o “notches” en el borde de las mismas afectando la morfología de la triple fila, 2) engrosamiento de las venas y 3) disminución del área entre las venas L3 y L4 del ala (Figura 17D). Sin embargo, las alas de las moscas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS miR-7-DsRed/+* desarrolladas a 17°C y que combinan la falta de *miR-7* con altos niveles de *miR-7*, no presentaban ni las muescas ni el engrosamiento característicos de la sobre-expresión, indicando que la falta de *miR-7* es capaz de suprimir el fenotipo de sobre-expresión (Figura 17E). Para analizar si esta supresión también tenía lugar en el caso del fenotipo de reducción del tamaño del ala, se clasificó el tamaño de las alas de las moscas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS miR-7-DsRed/+* y se comparó con el tamaño de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* (Figura 17F y Figura 21). Los resultados indican que la distribución en las diferentes clases de los porcentajes de *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS miR-7-DsRed/+* son Clase 1: 25%, Clase 2: 25% y Clase 3: 50% (Figura 17K). Esto supone un cambio respecto a la distribución de las clases de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* donde la Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5%. Estos resultados indican que la sobre-expresión de *miR-7* no solo rescata el fenotipo de la morfología del ala sino que también rescata el tamaño. Por tanto, los fenotipos observados en las alas tanto morfológicamente como de tamaño en moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* son debidos a la falta de función de *miR-7*.

Por otro lado, la siguiente estrategia para rescatar el fenotipo observado en las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* fue generar una duplicación genómica de *miR-7*, que se denominó *P[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}* y que permite la expresión ubicua de *miR-7*, bajo el control del promotor de la *tubulina* que puede ser detectada por la expresión de GFP (Materiales y Métodos) (Figura 17 G). Las moscas transgénicas conteniendo la construcción *P[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}/+* presentan alas normales (Figura 17H). Se analizó el fenotipo de las moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; P[tub-eGFP-miR-7]^{RCA}/+* (Figura 17I) y se clasificaron en las clases previamente descritas siguiendo los mismos criterios (Figura 17J y Figura 21). Los resultados indican que la distribución de las clases es Clase 1: 22%, Clase 2: 28% y Clase 3: 50% (Figura 17K). Por tanto, se observó una disminución significativa del porcentaje de las Clases 1 y 2 y un aumento de la Clase 3 comparándolo con los porcentajes observados en moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* cuyos porcentajes eran Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5%. Este resultado apoya que el fenotipo de disminución del tamaño del ala observado en moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* es debido a la ausencia de *miR-7*, indicando que juega un papel en el control del tamaño del ala.

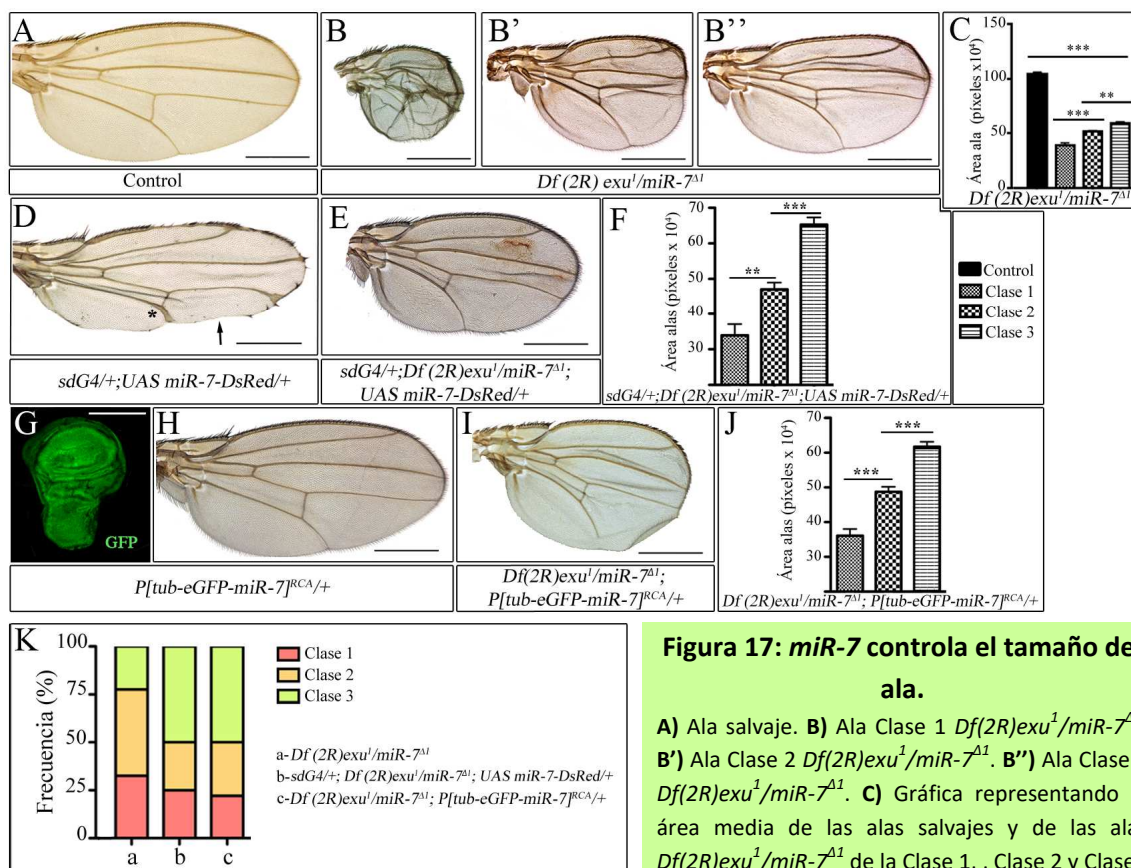


Figura 17: *miR-7* controla el tamaño del ala.

A) Ala salvaje. **B)** Ala Clase 1 *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. **B')** Ala Clase 2 *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. **B'')** Ala Clase 3 *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. **C)** Gráfica representando el área media de las alas salvajes y de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3.

En conjunto, los resultados de los experimentos de rescate, tanto con la sobre-expresión como con la duplicación de *miR-7* validan el uso de la combinación alélica *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* para analizar la función de este microRNA en el ala. Además, estos resultados indican que *miR-7* se requiere para el correcto desarrollo del ala.

1.1.d *miR-7* regula el crecimiento del ala controlando el tamaño celular a través del control de la progresión del ciclo celular

La reducción del tamaño de las alas que presenta la falta de función de *miR-7* podría deberse a su posible papel en la regulación de la apoptosis o bien en el control de la proliferación. Primero, se examinó si los discos de larvas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* presentaban expresión de la Caspasa-3 activada (referida a partir de ahora como C3), como indicador de la presencia de apoptosis. En condiciones normales de desarrollo, en los discos de ala de tercer estadio no hay apoptosis y, por tanto, no presentan expresión significativa de C3 (datos no mostrados, Gonzalez & Busturia, 2009). Cuando se compararon los niveles de expresión de C3

en discos de larvas salvajes con discos de larvas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, no se obtuvo diferencia (datos no mostrados), señalando que no hay activación de la vía apoptótica en los discos imaginales en ausencia de *miR-7* y que, por tanto, los fenotipos observados en las alas no parecen ser debidos a la inducción de muerte celular.

Debido a que las alas deficientes para *miR-7* presentan un tamaño más pequeño que no es debido a muerte celular, se decidió investigar si la falta de *miR-7* tenía un efecto en el tamaño celular. Primero se analizó por citometría de flujo (FACS) el tamaño celular de las células del disco de ala de larvas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Para ello se diseccionaron los discos y se realizó el análisis de tamaño de las células del disco de ala por FACS. Se observó que el tamaño celular entre *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* y las células salvajes era similar (Figura 18A-B). Por otro lado, se analizó si existía una variación del tamaño celular mediante el análisis de la densidad de tricomas del ala. El ala de *Drosophila* está recubierta por tricomas y cada uno de ellos es secretado por una única célula epidermal, por lo que un tricoma equivale a una célula en el territorio de ala (Robertson, 1959). Dado que el tamaño de las alas de moscas de tipo salvaje es constante, el número de células/área equivale a la densidad de tricomas. Cuando existe una variación de tamaño celular, esta relación varía respecto a las alas salvajes, por ejemplo, en el caso de que sean células más pequeñas, habrá mayor número de tricomas por área (tricomas/área), es decir, mayor densidad de tricomas/área. Al comparar la densidad de tricomas en alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* y en alas salvajes, se observó un aumento del 25% en las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, apuntando que las células mutantes son más pequeñas que las salvajes (Figura 18C-F).

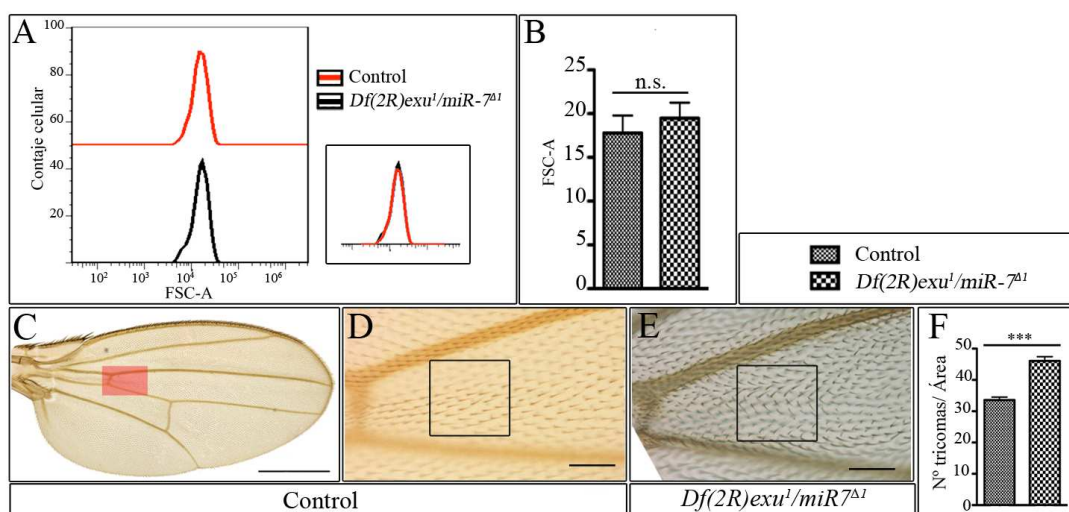


Figura 18: Análisis del tamaño celular de discos y alas mutantes para *miR-7*.

A) Gráfica representando el tamaño de las células disociadas del discos de ala salvaje (rojo) versus *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* (negro) (FSC-A: Forward Scatter Area). Obsérvese en el recuadro que ambas curvas solapan. **B)** Gráfica representando el tamaño (FSC-A) de las células salvajes y células *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Se realizaron tres experimentos independientes de al menos n=10 discos cada vez. **C)** Ala salvaje señalando en rojo la región donde se cuantificó la densidad de tricomas que se muestra ampliada en (D). **D)** Ala control señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **E)** Ala *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **F)** Gráfica representando el número de tricomas por área de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). Las barras de calibración representan 500 µm para el ala y 50 µm para la ampliación de las alas. n.s.: no significativo y *** p<0,001.

Ya que la medición del tamaño celular en las células de los discos indica que no hay variación del tamaño celular y, por el contrario, los datos de densidad de tricomas indican que las células de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{A1}* son más pequeñas que las células de las alas salvajes, los resultados sugieren que la reducción observada en las alas adultas ocurre más tarde del tercer estadio, probablemente durante la pupación de la larva.

En conjunto los resultados indican que *miR-7* se necesita para promover crecimiento controlando el tamaño celular.

1.1.e Búsqueda de posibles dianas de *miR-7*. Análisis de sensores.

Para empezar a descifrar los mecanismos mediante los cuales *miR-7* controla el tamaño del ala, se realizó una búsqueda bioinformática de sus genes diana, haciendo uso principalmente de la base de datos www.microRNA.org. Se puso especial interés en los genes de la vía de Notch y Wingless, en los genes de la familia de los grupos Polycomb y trithorax y en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular.

En primer lugar, se comprobó si las regiones 3' UTR de los genes *cut* y *senseless* presentaban sitios de unión para *miR-7* no siendo el caso y, por tanto, resaltando que el efecto de la modulación de los niveles de *miR-7* sobre la expresión de Ct y Sens (Figura 15) es posiblemente indirecto. No obstante, resultados de otros laboratorios (Lai et al., 2005; Stark et al., 2003), como se expone más adelante, demostraron que *miR-7* se une a las regiones 3' UTRs de varias dianas de la vía de Notch. Asimismo, estudios previos del laboratorio (Tesis doctoral Ricardo Aparicio) analizaron la región 3' UTR del gen *dRYBP* (*Drosophila Ring and YY1 Binding Protein*), un factor epigénético que interacciona con proteínas del grupo Polycomb y del grupo trithorax y que está implicado en el desarrollo del ala (Feres et al., 2014; Gonzalez et al., 2008). El análisis reveló que dicha región contiene al menos 33 sitios de unión para microRNAs (Tesis doctoral Ricardo Aparicio) siendo *miR-7* uno de ellos. Incluso, la región de unión de *miR-7* a los genes *Yaf2* y *RYBP* (homólogos de *dRYBP* en mamíferos) está conservada (Aparicio et al. sin publicar), destacando que la expresión de este gen durante el desarrollo de la mosca, ratón y humano podría estar controlada por *miR-7*. Por otro lado, respecto al análisis de genes involucrados en el ciclo celular y posiblemente regulados por *miR-7*, se observó la presencia de sitios de unión para *miR-7* en la región 3'UTR de *dacapo* (*dap*), inhibidor de ciclo celular y homólogo de p21 de mamíferos (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996).

Como paso previo para analizar la función de *miR-7* en la regulación de los genes de interés, se procedió al análisis del efecto de la sobre-expresión de *miR-7* en la expresión de los "sensores" que contienen las regiones 3' UTR de los genes fusionadas a GFP. Tanto para el gen *dRYBP* (Aparicio et al. sin publicar) como para los genes del Complejo del *Enhancer of Split* (*E(spl)-C*) (Lai et al., 2005; Stark et al., 2003) la interacción de *miR-7* con dichos sensores ya había sido realizada. Por tanto, se procedió al análisis del sensor de *dacapo*.

Debido a la presencia de sitios de unión para *miR-7* en la región 3' UTR de *dacapo* (*dap*), se decidió analizar la expresión *in vivo* del "sensor" de *dacapo* (que contiene la región 3' UTR de *dacapo*, el promotor ubicuo de la *tubulina* y el gen *GFP*) en los discos de ala (Figura 19A). Para la sobre-expresión de *miR-7* se utilizó la línea *UAS-miR-7-140₁*, la cual se ha demostrado que promueve la expresión de altos niveles de *miR-7* eficientemente (Li et al., 2009). Se analizó la expresión de GFP de los discos de larvas *enG4/3'UTR dap-GFP; UAS miR-7-140₁/+* y se comparó con la expresión de GFP de discos control *3'UTR dap-GFP*. Se observó que la expresión de GFP disminuía especialmente en las células adyacentes al borde A/P pertenecientes al

compartimento posterior en presencia de *miR-7* (Figura 19B-B''), indicando que los sitios predichos de *miR-7* en la región 3' UTR de *dap* son funcionales.

En conclusión, los resultados del análisis de la respuesta del sensor a los altos niveles de *miR-7* indican que podría ejercer su función regulando a *dacapo*.

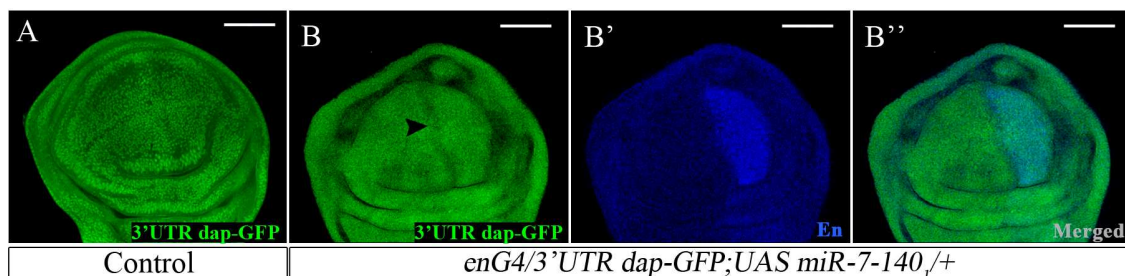


Figura 19: El sensor de *dacapo* responde a los altos niveles de *miR-7* en el disco de ala.

A) Disco 3'UTR *dap*-GFP (sensor, control) mostrando la expresión de GFP (verde). **(B-B'')** Disco *enG4/3' UTR dap-GFP; UAS miR-7-140/+*. **B)** Expresión de GFP (verde). La cabeza de flecha señala donde se observa una disminución de GFP. **B')** Expresión de Engrailed (En, azul) marcando el compartimento posterior. **B'')** Superposición de las imágenes (B) y (B'). Las barras de calibración representan 50 μ m.

1.1.f Análisis de la interacción genética entre *miR-7* y la vía de Notch, *dRYBP* y *dacapo* en el control del tamaño del ala

Se decidió investigar la interacción genética entre *miR-7* y componentes de la vía de Notch, así como con los genes *dRYBP* y *dacapo*. Para ello, se diseñaron experimentos de “modulación” del tamaño del ala de moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* al combinarse con mutantes heterocigóticos para el gen diana de estudio. De este modo, se puede analizar la contribución de dichos genes diana al fenotipo observado en falta de función de *miR-7*. Si en condiciones normales de desarrollo, *miR-7* regula negativamente la expresión de los genes diana, se esperaría que en ausencia de *miR-7*, es decir, *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, la expresión de dichos genes estuviese aumentada. Así, si en ausencia de *miR-7*, se elimina una copia del gen diana, se esperaría observar un “rescate” en el tamaño, es decir, que el tamaño de las alas fuera mayor que en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*.

En primer lugar, se examinó si *miR-7* controla el desarrollo del ala a través de la regulación de los genes del Complejo *Enhancer of Split*. Para ello se utilizó *E(spl)-C $\Delta^{m\delta-m6}$* , el cual elimina los genes *m δ* , *m γ* , *m β* , *m α* , *m1*, *m2*, *m3*, *m4*, *m5* y *m6* del complejo (Bardin et al., 2010), y se generaron moscas *miR-7^{Δ1}/CyO; E(spl)-C $\Delta^{m\delta-m6}$ /TM6B* que se cruzaron con moscas *Df(2R)exu¹/CyO*. La combinación *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; E(spl)-C $\Delta^{m\delta-m6}$ /+* resultó ser letal, por lo que se decidió analizar la interacción genética de *miR-7* con mutantes de los genes *Notch* y *cut* como dianas indirectas.

Por un lado se empleó el mutante nulo *N^{55e11}* (Kidd et al., 1983). Se generaron moscas *N^{55e11}/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* y se analizó el número de “notches” o muescas en las alas. Las moscas *N^{55e11}/+* presentan un “notch” entre las venas L3 y L4 en el 56% de los individuos (Figura 20A). Sin embargo, las moscas *N^{55e11}/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* no presentan estas muescas (0%), indicando que el fenotipo debido a la falta de función de *Notch* se rescata en ausencia de *miR-7* (Figura 20B). Los resultados indican que las alas *N^{55e11}/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* son más grandes que las alas de las moscas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* reflejándose en el cambio en la

distribución de las clases, siendo Clase 1: 29%, Clase 2: 29% y Clase 3: 42% (Figura 20M), frente a la Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5% en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*.

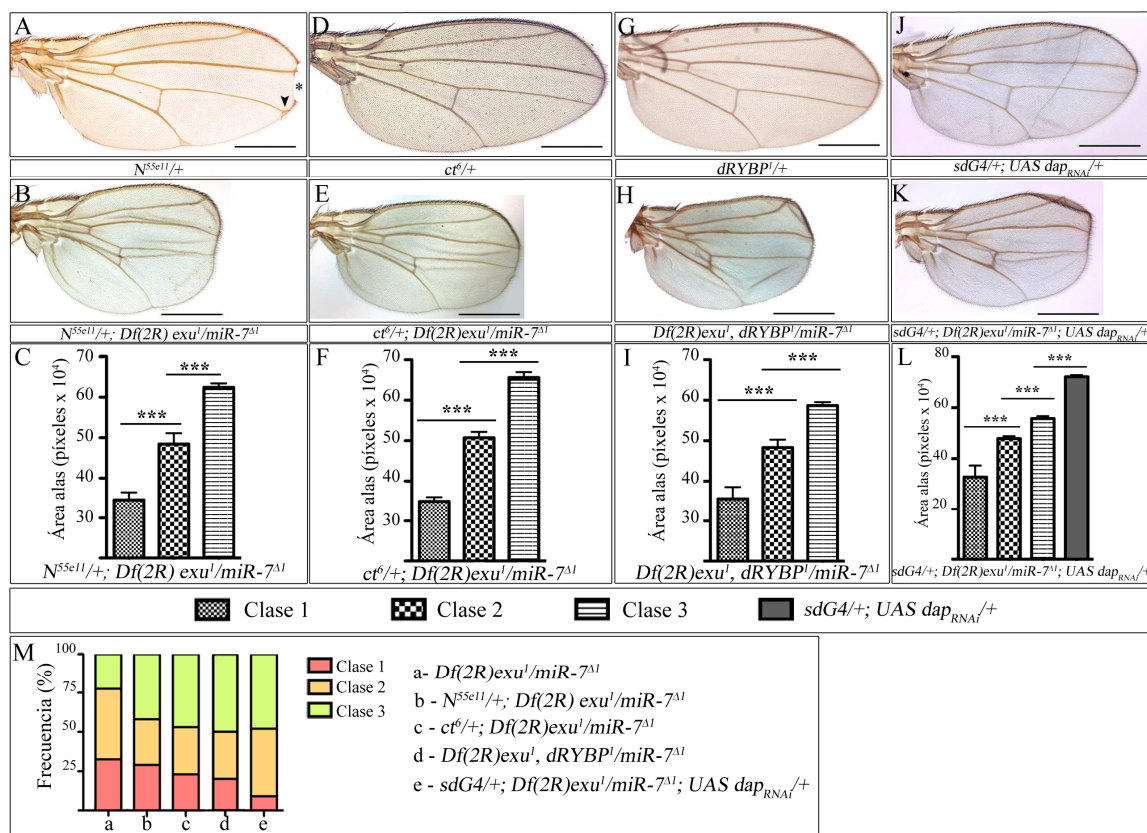


Figura 20: Interacción genética entre *miR-7* y *Notch*, *cut*, *dacapo* y *dRYBP*.

A) Ala *N^{55e11}/+*. Nótese el engrosamiento de las venas (cabeza de flecha) y la muesca situada entre las venas L3 y L4 (asterisco). **B)** Ala *N^{55e11}/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* de Clase 3. Compárese la ausencia de engrosamiento de venas y la muesca señalada en (A). **C)** Gráfica representando el tamaño de las alas *N^{55e11}/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3 (n=20 alas). **D)** Ala *ct⁶/+*. **E)** Ala *ct⁶/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* de Clase 3. **F)** Gráfica representando el tamaño de las alas *ct⁶/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3 (n=20 alas). **G)** Ala *dRYBP¹/+*. **H)** Ala *Df(2R)exu¹; dRYBP¹/miR-7^{Δ1}* de Clase 3. **I)** Gráfica representando el tamaño de las alas *Df(2R)exu¹; dRYBP¹/miR-7^{Δ1}* de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3 (n=20 alas). **J)** Ala *sdG4/+; UAS dap_{RNAi}/+*. **K)** Ala *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS dap_{RNAi}/+* de Clase 3. **L)** Gráfica representando el tamaño de las alas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS dap_{RNAi}/+* de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3 y las alas *sdG4/+; UAS dap_{RNAi}/+* (n=20 alas para ambos genotipos). Nótese que a pesar de que las alas *sdG4/+; UAS dap_{RNAi}/+* muestran una reducción del 30%, siguen siendo de mayor tamaño que la Clase 3 de las alas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS dap_{RNAi}/+*. **M)** Gráfica representando la frecuencia de la Clase 1 (rojo), Clase 2 (naranja) y Clase 3 (verde) de cada uno de los genotipos señalados (n= 20 alas para cada genotipo excepto para *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* donde n= 40 alas). Las barras de calibración representan 500 μ m. *** p<0,001.

Por otro lado, se redujeron los niveles de *cut* empleando el mutante *ct⁶* (Johnson & Judd, 1979). Las alas *ct⁶/+* son similares a alas salvajes (Figura 20D), por lo que se analizó si la modulación de los niveles de *cut* tenían algún efecto en las alas deficientes para *miR-7*. Al caracterizar las moscas *ct⁶/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* se observó, un aumento del tamaño de las alas (Figura 20E) respecto a las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* y, del mismo modo, una disminución en la frecuencia de las Clases 1 y 2 junto con un aumento en la Clase 3, de forma que la distribución de las alas *ct⁶/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* es Clase 1: 23%, Clase 2: 30% y Clase 3: 47% (Figura 20M), frente a la Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5% en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Los resultados de la modulación de los fenotipos utilizando los mutantes *Notch* y de *cut*,

confirman que *miR-7* en parte controla el tamaño del ala a través de la regulación de la vía de Notch.

Siguiendo el mismo esquema para *dRYBP*, se empleó el mutante nulo *dRYBP¹* que en heterocigosis no produce fenotipos visibles en el ala adulta (Figura 20G) (Gonzalez et al., 2008). Debido a que los *loci* de *dRYBP* y de *miR-7* están en el segundo cromosoma, se obtuvieron moscas, mediante recombinación (Materiales y métodos), que contenían ambas mutaciones en el mismo cromosoma y se generó el stock *Df(2R)exu¹,dRYBP¹/CyO* para ser cruzado con moscas *miR-7^{Δ1}/CyO* y analizar los tamaños de las alas de las moscas progenie *Df(2R)exu¹,dRYBP¹/miR-7^{Δ1}* (Figura 20H). Se observó que la distribución de las alas *Df(2R)exu¹,dRYBP¹/miR-7^{Δ1}* en las diferentes clases variaba respecto a la distribución de las alas en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Siendo la Clase 1: 20%, Clase 2: 30% y Clase 3: 50% (Figura 20 M), frente a la Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5% en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Estos resultados sugieren que *miR-7* está controlando el crecimiento del ala a través de la regulación de *dRYBP*.

Por último, en el caso de *dacapo*, se empleó un ARN de interferencia (RNAi, #HMS01610). Las alas de las moscas *sdG4/+;UAS dap_{RNAi}/+* desarrolladas a 25°C presentan una morfología muy similar a las alas salvajes (Figura 20J). Sin embargo su tamaño se encuentra reducido un 30% respecto a alas salvajes (Figura 20L). Al cuantificar la frecuencia y severidad de la reducción de las alas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1};UAS dap_{RNAi}/+* (Figura 20K), se observó un cambio en la distribución de las clases siendo Clase 1: 9%, Clase 2: 43% y Clase 3: 48% (Figura 20M), frente a la Clase 1: 32,5%, Clase 2: 45% y Clase 3: 22,5% en *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Por consiguiente, la inactivación simultánea de *dacapo* y *miR-7* disminuye significativamente la frecuencia de la Clase 1 y aumenta especialmente la frecuencia de la Clase 3, indicando que el tamaño de las alas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1};UAS dap_{RNAi}/+* son mayores que las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*. Por lo que se concluye que *miR-7* controla el crecimiento del ala a través de la regulación de *dacapo*.

Para asegurar que las clases de las alas de cada genotipo estaban clasificadas correctamente según el criterio establecido para *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* se analizó por un lado, que las clases establecidas en cada genotipo fueran significativamente diferentes (Figura 20C,F,I,L) y por otro lado, que el tamaño de las alas de la clase establecida para cada genotipo no fuera significativamente diferente de las alas de la correspondiente clase de *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* (Figura 21).

En conjunto, los resultados de los experimentos de interacción genética indican que *miR-7* colabora con la vía de Notch, *dRYBP* y *dacapo* en el control del tamaño del ala.

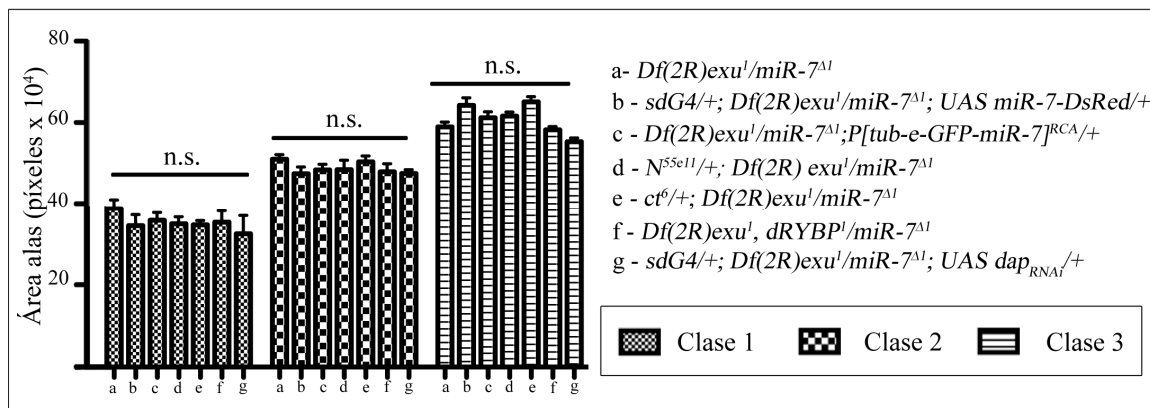


Figura 21: Validación estadística del criterio de clasificación del tamaño de las alas.

Gráfica representando el tamaño de las alas de la Clase 1, Clase 2 y Clase 3 de cada genotipo indicado. Obsérvese que entre los distintos genotipos de la misma Clase no existen diferencias estadísticas significativas. n.s.: no significativo. Para el análisis se empleó el estadístico one-way ANOVA con el post-test de Tukey. Se empleó el área de al menos 20 alas por genotipo.

1.2 Análisis de la función de *miR-306* en el desarrollo del ala

1.2.a La falta de función de *miR-306* disminuye el tamaño del ala controlando tamaño celular

El microRNA *miR-306* se encuentra citogenéticamente localizado en la región 36A10 del cromosoma II y forma parte de un clúster junto a los microRNAs *miR-9b*, *miR-9c* y *miR-79*, localizados en una región intrónica del gen *grapes* (Figura 22).

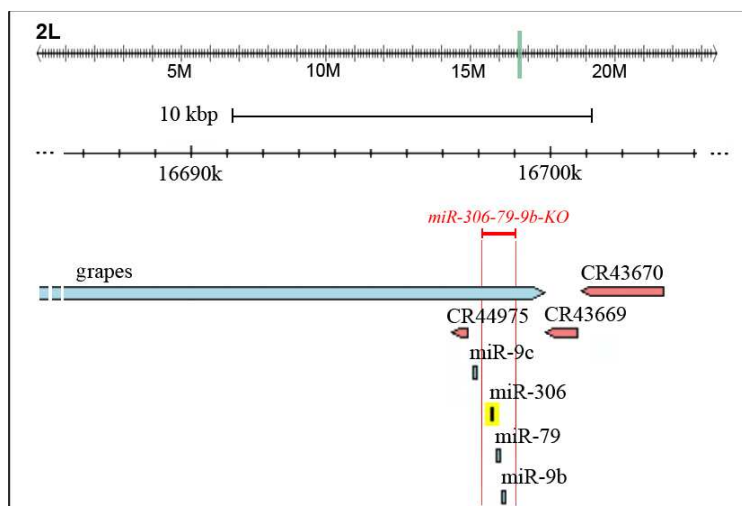


Figura 22: Localización genómica de *miR-306*.

Se encuentra localizado citogenéticamente en la región 36A10 en el cromosoma 2L, en una región intrónica del gen *grapes* y forma parte de un clúster junto a los microRNAs *miR-9c*, *miR-79* y *miR-9b*. En rojo se representa la región genómica que elimina la deficiencia *miR-306-79-9b-KO* empleada en este estudio.

Para el análisis de los fenotipos asociados a la falta de función de *miR-306* se emplearon dos herramientas existentes: las moscas transgénicas conteniendo la esponja de *miR-306*: *UAS GFP-miR-306sp* (sp= esponja) (Eun et al., 2013) y el mutante de falta de función *miR-306-79-9b-KO* (Chen et al., 2014), que se detallan a continuación.

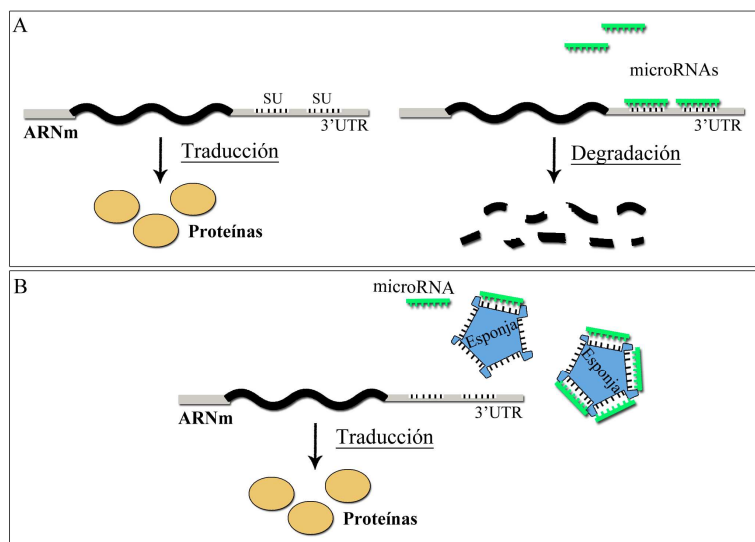


Figura 23: Representación esquemática del mecanismo de acción de las esponjas de microRNAs.

A) Los sitios de unión (SU) específicos para distintos microRNAs se encuentran en la región 3'UTR de los ARN mensajeros. Cuando un microRNA se une por complementariedad de bases al SU, el ARNm es generalmente degradado. **B)** Las esponjas contienen múltiples repeticiones en tándem de los SU disponibles de forma que el

microRNA se une a los SU disponibles en la esponja impidiendo que se una al ARNm, y por tanto, permitiendo de esta manera su traducción.

Las “esponjas” se usan para inactivar la función de microRNAs específicos. Contienen repeticiones en tándem, generalmente entre 4 y 10 veces, del sitio de unión para el microRNA de interés, y separados entre sí por tan solo unas pares de bases. Para poder controlar su expresión temporal y espacial las esponjas se clonan en vectores que contienen secuencias UAS (Ebert et al., 2007; Loya et al., 2009). De este modo, cuando se expresan altos niveles de la esponja bajo el control espacio-temporal de un Gal4, al haber más disponibilidad de secuencias diana libres en la esponja, éstas secuestran al microRNA, impidiendo que éste se una a su gen diana, y por tanto generándose así una falta de función del microRNA (Figura 23). Cuando se sobre-expresó la esponja para *miR-306* mediante la línea *daughterless Gal4 (daG4)* que se expresa ubicuamente y durante todo el desarrollo (Figura 11), se observó que las alas de las moscas *UAS GFP-miR-306sp/+; daG4/UAS GFP-miR-306sp*, a pesar de mostrar un patrón morfológico similar a las alas salvajes (Figura 24A-B), presentaban una reducción del tamaño del 27% respecto a las alas control, indicando que la inactivación de *miR-306* produce alas con el tamaño reducido (Figura 24C).

Por otro lado, se hizo uso de una deficiencia genómica de la región 36A10 denominada *miR-306-79-9b-KO*, que deletiona los microRNAs *miR-306*, *miR-79* y *miR-9b* (Figura 22, Chen et al., 2014). Los individuos homocigóticos *miR-306-79-9b-KO* se desarrollan con normalidad, alcanzando el estadio adulto, sin defectos morfológicos visibles en el patrón del ala (Figura 24D). Sin embargo, al analizar el tamaño de las alas, se observó que eran un 10% más pequeñas que las alas de moscas salvajes (Figura 24E).

Se estudió si esta reducción de tamaño era debida a una activación ectópica de la vía apoptótica o a que las células no proliferaban correctamente. Tanto los discos de larvas que sobre-expresaban la esponja de *miR-306* (*UAS GFP-miR-306sp/+; daG4/UAS GFP-miR-306sp*), como los discos de larvas *miR-306-79-9b-KO*, al igual que ocurre en los discos salvajes, no presentan expresión de C3 (datos no mostrados) indicando que la falta de función de *miR-306* no activa muerte celular y que, por consiguiente, la apoptosis no está implicada en la reducción del tamaño del ala observado en las alas deficientes para *miR-306*.

A continuación, se analizó el tamaño de las células mediante el estudio de la densidad de tricomas en el ala (un tricoma= una célula, como se mencionó en el apartado 1.1.d de

Resultados, Robertson, 1959). Se observó que las alas *miR-306-79-9b-KO* presentaban un aumento en la densidad de un 16% más de tricomas/área, es decir, la falta de función de *miR-306* produce alas más pequeñas debido a la reducción del tamaño celular (Figura 24F-H).

Por consiguiente, estos resultados indican que *miR-306* se requiere para el correcto desarrollo del ala y su falta de función afecta el tamaño celular.

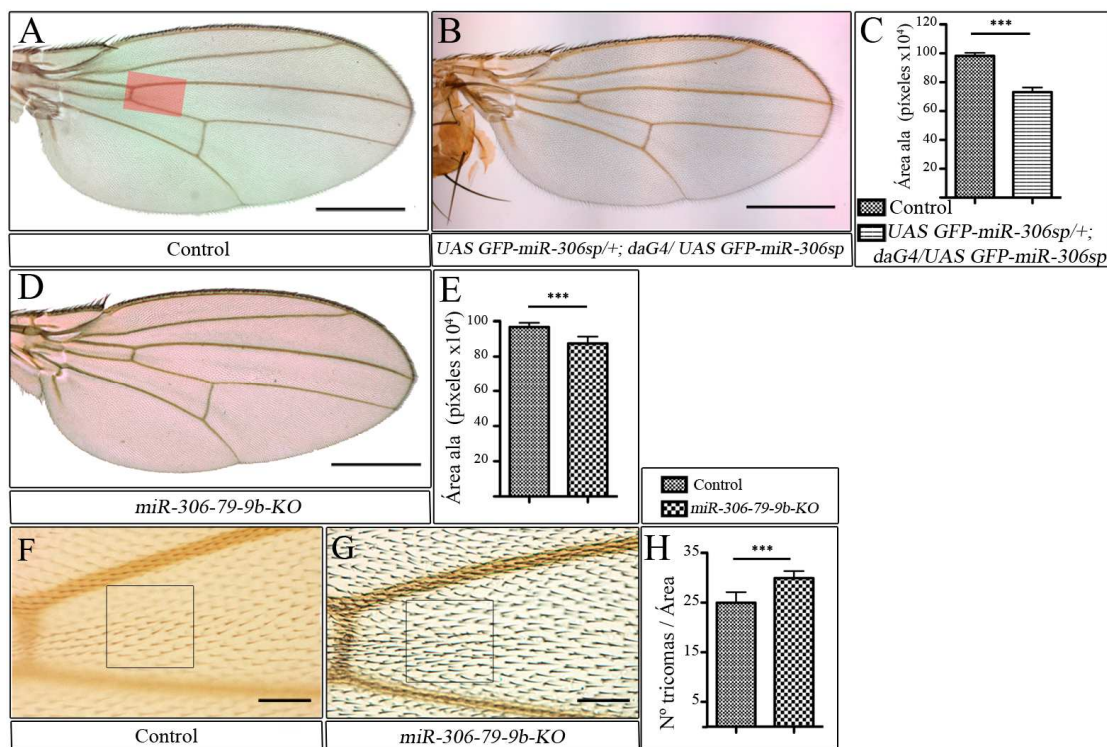


Figura 24: La falta de función de *miR-306* afecta el tamaño del ala.

A) Ala salvaje, se indica en rojo la región seleccionada para la cuantificación de la densidad de tricomas. **B)** Ala *UAS GFP-miR-306sp; daG4/UAS GFP-miR-306sp*. Nótese la diferencia de tamaño respecto a (A). **C)** Gráfica representando el tamaño de las alas *UAS GFP-miR-306sp; daG4/UAS GFP-miR-306sp* respecto a las alas salvaje (n=20 alas para cada genotipo). **D)** Ala *miR-306-79-9b-KO*. Nótese la diferencia de tamaño respecto a (A). **E)** Gráfica representando el tamaño de las alas *miR-306-79-9b-KO* respecto a las alas salvajes (n=20 alas para cada genotipo). **F)** Ala control señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **G)** Ala *Df(2R)exu¹/miR-7^{A1}* señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **H)** Gráfica representando el número de tricomas por área de los de las alas control versus las alas *miR-306-79-9b-KO* (n=20 alas para cada genotipo). Las barras de calibración representan 500 μ m para las alas y 50 μ m para la ampliación de las alas. *** $p < 0,001$.

1.2.b Altos niveles de *miR-306* afectan el desarrollo del ala y activan apoptosis en los discos de ala.

Para estudiar el fenotipo debido a los altos niveles de *miR-306* se analizaron las alas usando dos líneas transgénicas distintas: la línea *UAS GFP-miR-306^{xc}* (Eun et al., 2013) y una línea creada en el laboratorio denominada *UAS miR-306²⁰-DsRed* (Aparicio et al. sin publicar) en conjunción con las líneas *enG4* y *sdG4* que, respectivamente dirigen la expresión en el compartimento posterior del ala y en el territorio del disco de ala o “wing pouch”, que dará lugar al ala propiamente dicha (Figura 11).

Las alas de moscas *enG4/UAS GFP-miR-306^{XC}; UAS GFP-miR-306^{XC}/+* crecidas a 29°C (Figura 25A-B) presentan una reducción del tamaño del compartimento posterior del 40% cuando se compara con el compartimento posterior de alas control (Figura 25C). Además se observó que las alas presentan el patrón de intervenas afectadas y la vena L5 interrumpida.

Por otro lado, se analizaron las alas *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* crecidas a 29°C. Se advirtió que las alas y halterios de las moscas supervivientes presentan un fenotipo muy fuerte, con malformaciones y ambos apéndices muy reducidos (Figura 25D). A 25°C, las alas *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* (Figura 25E) presentan una reducción de tamaño significativa del 25% respecto a alas control (Figura 25I) y permite apreciar el patrón de las venas el cual presenta la vena L5 interrumpida en un 85% de los casos. Asimismo, el tamaño de los halterios se encuentra reducido (Figura 25F-G). Se comprobó si los fenotipos de reducción de tamaño y la vena L5 interrumpida eran debidos a los altos niveles de *miR-306* y para ello se sobre-expresó *miR-306* en moscas *miR-306-79-9b-KO*, las cuales son deficientes para *miR-306*. El área de las alas *sdG4/+; miR-306-79-9b-KO; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* a 25°C (Figura 25H) resultan un 11% más grandes que las alas *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* (Figura 25I), indicando, por tanto, que el fenotipo de sobre-expresión es debido a *miR-306*. Curiosamente, a pesar de que el tamaño era rescatado, no se observó un rescate en el fenotipo de la vena L5 interrumpida.

A continuación, se analizó la densidad de tricomas para comprobar el efecto de los altos niveles de *miR-306* sobre el tamaño de las células. Las alas *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* de moscas desarrolladas a 25°C presentan un 20% menos de tricomas/área que las alas control (Figura 25J-K). Esto indica que las células con altos niveles de *miR-306* son más grandes.

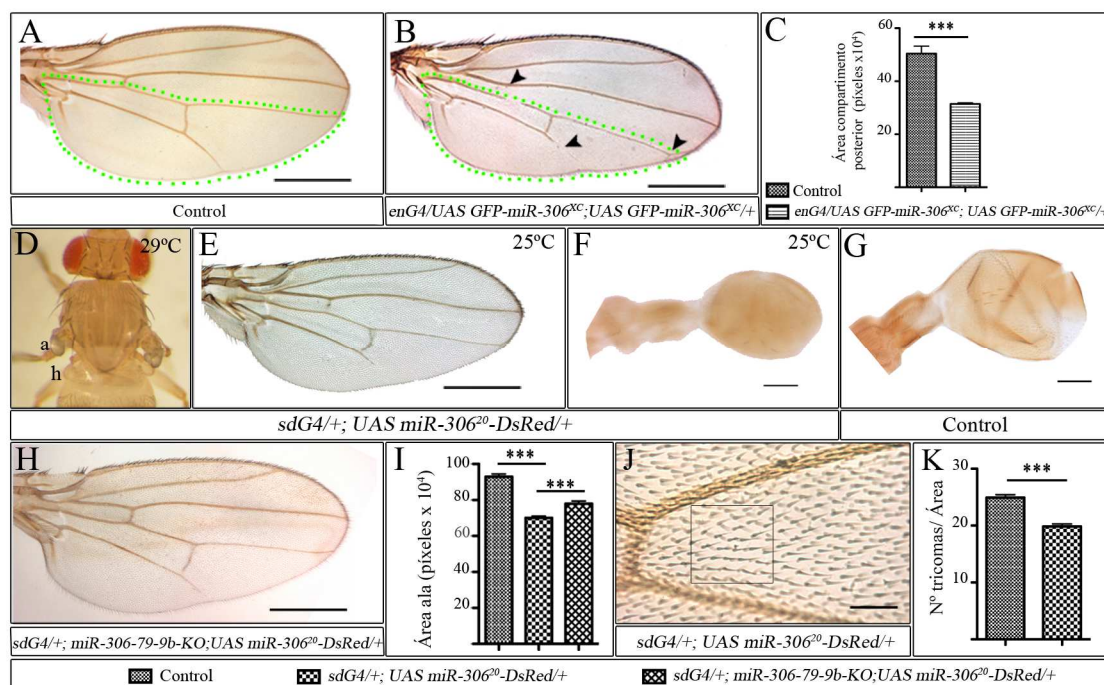


Figura 25: La sobre-expresión de *miR-306* afecta el desarrollo del ala.

A) Ala salvaje de mosca *y^{1w¹¹¹⁸}*. Los puntos verdes indican el área que comprende el compartimento posterior. **B)** Ala *enG4/UAS GFP-miR-306^{XC}; UAS GFP-miR-306^{XC}/+*. Nótese el defecto en el patrón de las venas (cabezas de flecha) y la disminución del tamaño del compartimento posterior (punteado verde) respecto a (A). **C)** Gráfica representando el tamaño del compartimento posterior de las alas *enG4/UAS GFP-miR-306^{XC}; UAS GFP-miR-*

306^{xc}/+ respecto a las alas salvajes de moscas *y¹w¹¹¹⁸* (n=20 alas para cada genotipo). **D**) Mosca *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* desarrollada a 29°C. Nótese la fuerte reducción del ala (a) y del halterio (h). **E**) Ala *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* desarrollada a 25°C. Nótese el defecto en el patrón de venas (cabeza de flecha) y la reducción general del tamaño. **F**) Halterio *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* desarrollado a 25°C. Obsérvese la diferencia de tamaño respecto a (G). **G**) Halterio salvaje. **H**) Ala *sdG4/+; miR-306-79-9b-KO; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*. Apréciase el rescate en el patrón de las venas y tamaño respecto a (E). **I**) Gráfica representando el tamaño de las alas de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). **J**) Ala *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **K**) Gráfica representando el número de tricomas por área de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). Las barras de calibración representan 500 µm para las alas y 50 µm para la ampliación de las alas y los halterios. *** p<0,001.

También se analizó la expresión de C3 como marcador de la apoptosis en discos de ala *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* crecidas a 29°C. Se observó una fuerte expresión de C3 (Figura 26A-A'') indicando la activación de la vía apoptótica. A su vez esta apoptosis fue significativamente disminuida cuando se inhibió la activación de la apoptosis mediante la sobre-expresión de DIAP1 (Figura 26B), un inhibidor de la caspasa iniciadora Dronc y que por tanto, impide la activación de las caspasas efectoras (Hay et al., 1995) inhibiendo la respuesta apoptótica. Como se observa en la Figura 26C, al comparar los niveles de C3 en los discos *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* con los discos control *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*, se observó una disminución significativa del 62% de los niveles de C3 en presencia de altos niveles de DIAP1.

Para comenzar a descifrar los mecanismos por los cuales altos niveles de *miR-306* inducen apoptosis, se analizó si la apoptosis era dependiente de los niveles de Dp53. Para ello se utilizó la construcción *UAS Dp53^{RNAi}*. En los discos de ala *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53^{RNAi}* (Figura 26D) se observó una disminución significativa del 35% de los niveles de C3 comparado con los niveles de C3 en los discos control *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* (Figura 26E). Además, se estudió si la dependencia de Dp53 era debida a que altos niveles de *miR-306* inducían la expresión de Dp53 y por tanto inducían apoptosis. Para analizar los niveles de Dp53 se utilizó una construcción denominada *p53-RE-GFP* que contiene un elemento de respuesta a Dp53, aislado del gen *reaper* al cual se sabe que se une Dp53, fusionado a la proteína GFP y denominado *p53-RE-GFP* (Wylie et al., 2014). Es de resaltar que la expresión de *p53-RE-GFP* en discos de ala salvajes no se detecta (Figura 26F), y sólo se observa activación de la expresión de GFP cuando existen altos niveles de Dp53 (ver más adelante, apartado 3, Figura 44A-A''). Se analizó la expresión de GFP en *sdG4/+; p53-RE-GFP/+ UAS miR-306²⁰-DsRed/+* y se descubrió que la sobre-expresión de *miR-306* activa la expresión de *p53-RE-GFP* (Figura 26G). Por tanto, estos resultados indican que los altos niveles de *miR-306* activan la apoptosis dependiente de la expresión de Dp53.

En conjunto, estos resultados indican que altos niveles de *miR-306* afectan el desarrollo del ala cuyo tamaño y el tamaño de sus células se ven afectados. Curiosamente, aunque el tamaño del ala está disminuido, probablemente debido a la muerte celular, el tamaño de las células es mayor. Este aumento del tamaño celular bien podría ser debido a que el ala "sensa" la pérdida celular e intenta compensar aumentando el tamaño de sus células. Además, estos resultados indican que el efecto en la morfología y el tamaño del ala son debidos a la inducción de la apoptosis, la cual es dependiente de *Dp53*.

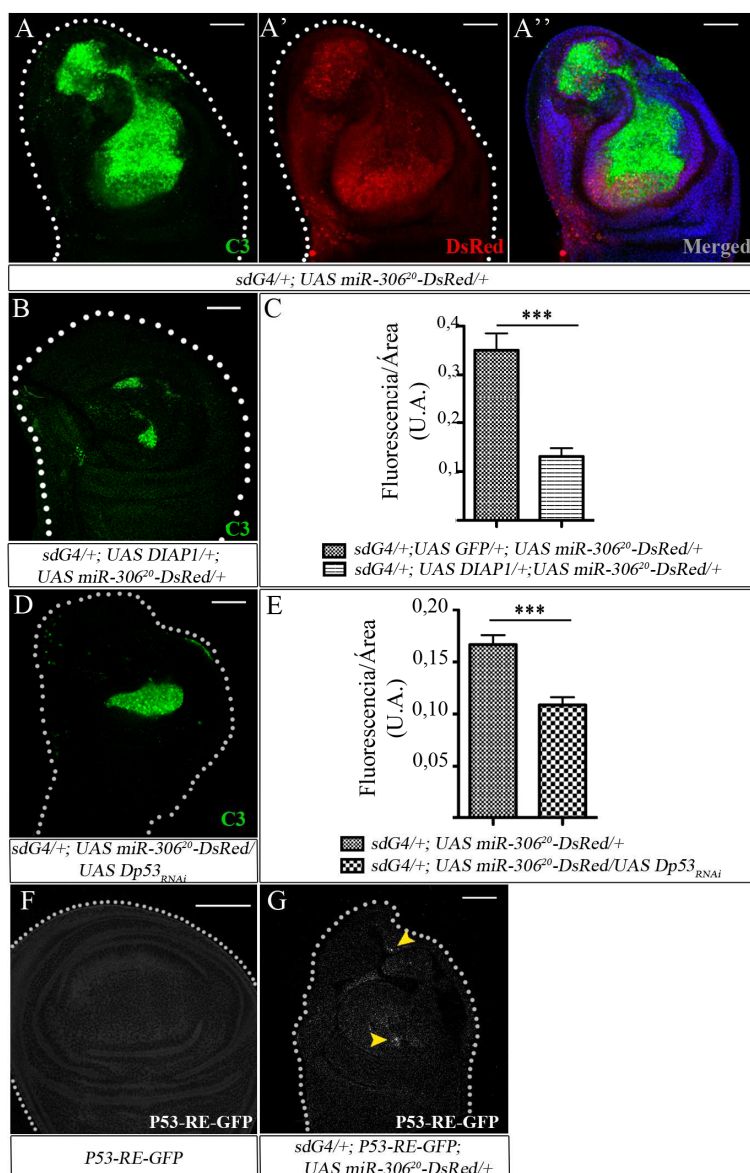


Figura 26: La sobre-expresión de *miR-306* induce apoptosis en el disco de ala.

(A-A'') Disco *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*. A) Expresión de C3 (verde). A') Expresión de Ds-Red (rojo). A'') Superposición de las imágenes (A) y (A'). B) Disco *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* donde se muestra la expresión de C3 (verde). Nótese la disminución del número de células expresando C3 respecto a (A). C) Gráfica representando la fluorescencia por área de los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* versus *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*. (U.A.- unidades arbitrarias) (n=12 discos para cada genotipo). D) Disco *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53^{RNAi}* donde se muestra la expresión de C3 (verde). Nótese la disminución del número de células expresando C3 respecto a (A). E) Gráfica representando la fluorescencia por área de los discos *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/+* versus *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53^{RNAi}*. (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=9 discos para cada genotipo). F) Expresión de GFP (blanco) del disco *P53-RE-GFP*, nótese la ausencia de expresión de GFP en condiciones salvajes. G) Expresión de GFP (blanco) del disco *sdG4/+; P53-RE-GFP; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*. Nótese que aunque la expresión de GFP (cabezas de flecha) es débil, es más apreciable cuando se compara con (F). Las barras de calibración representan 50 μ m. *** p<0,001.

1.2.c Búsqueda de genes diana de miR-306. Análisis de los sensores.

Al observar que la modulación de los niveles de *miR-306* afecta tanto al tamaño como al patrón de las alas, así como al tamaño de los halterios, se decidió realizar una búsqueda *in silico*, utilizando fundamentalmente la base de datos www.microRNA.org y (Stark et al., 2003), de genes diana implicados en el desarrollo del ala y del halterio. Entre los posibles candidatos a ser regulados según el criterio de la existencia de sitios de unión de *miR-306* en las regiones 3'UTR de los genes diana, se observó que estaban los siguientes: *Ultrabithorax (Ubx)*, gen homeótico que otorga la identidad a las células del halterio; *dRYBP*, factor epigenético y *abrupt (ab)*, factor de transcripción de la familia BTB-Zinc finger.

Se analizó el efecto de la sobre-expresión de *miR-306* en la expresión de cada uno de los sensores conteniendo o bien la región 3'UTR de *Ubx* (Ronshaugen et al., 2005), o la de *dRYBP* (Tesis Doctoral Ricardo Aparicio) y la de *ab* (Okamura et al., 2008) fusionados al promotor ubicuo del gen de la *tubulina* y a GFP. En los discos imaginales de ala *enG4/3'UTR Ubx-GFP*; *UAS miR-306²⁰-DsRed/+* y *3'UTR dRYBP-GFP/+*; *hhG4/ UAS miR-306²⁰-DsRed*, no se observaron variaciones en la expresión de GFP respecto a los discos control *3'UTR Ubx-GFP* o *3'UTR dRYBP-GFP* respectivamente. Por lo tanto, con estos experimentos no se pudo concluir si *miR-306* está regulando la expresión de *Ubx* y de *dRYBP*. Por el contrario, al comparar la expresión en discos control, *3'UTR ab-GFP* (Figura 27A), conteniendo el sensor de *ab* con discos *ptcG4/3'UTR ab-GFP*; *UAS miR-306²⁰-DsRed/+* donde la expresión de *miR-306* se dirigió bajo el control de *patched Gal4* (Figura 11), se observó que los niveles de GFP disminuían en las células adyacentes al borde Antero-Posterior (Figura 27B), precisamente donde dirige la expresión la línea *patched Gal4* (Figura 27B'-B''). Por lo tanto, *miR-306* regula la expresión del sensor *3'UTR ab-GFP in vivo*, sugiriendo que *miR-306* regula la expresión de *ab*.

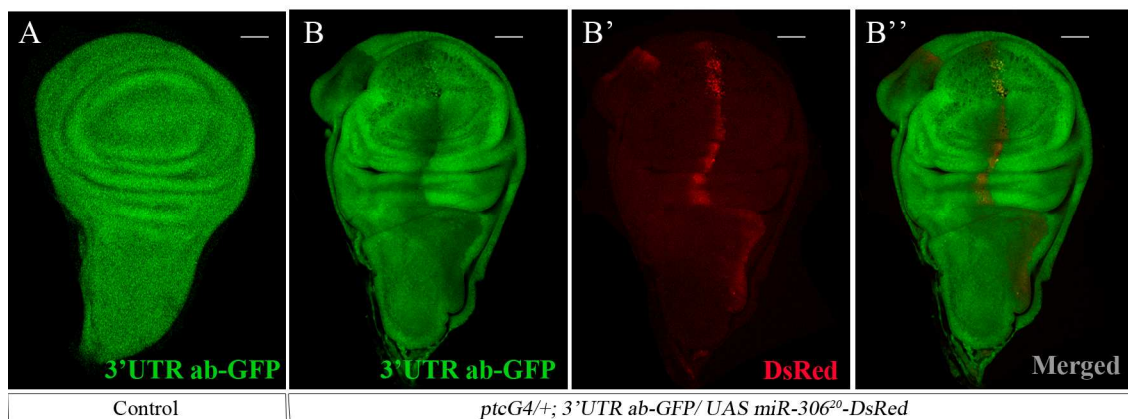


Figura 27: El sensor de abrupt responde a altos niveles de miR-306 en el disco de ala.

A) Disco control mostrando la expresión de GFP (verde), reportero de la actividad del sensor de abrupt. **(B-B'')** Disco *ptcG4/+; 3'UTR ab-GFP/UAS miR-306²⁰-DsRed*. **B)** Expresión GFP (verde). Obsérvese la disminución a lo largo del eje A/P, compárese con (A). **B')** Expresión de DsRed (rojo) a lo largo del eje A/P. **B'')** Superposición de las imágenes B y B'. Las barras de calibración representan 50 μm.

1.2.d miR-306 controla la expresión de abrupt

Debido al efecto que los altos niveles de *miR-306* tiene sobre la expresión del sensor de *abrupt*, se analizaron los niveles de proteína Abrupt en los discos de ala conteniendo altos niveles de *miR-306*. La tinción de discos salvajes con el anticuerpo contra Abrupt revela una

expresión ubicua en todo el disco con una mayor expresión en la región presuntiva de las venas L2, L4 y más fuerte en la vena L5 (Figura 28A-A'). Sin embargo, en los discos *hhG4/UAS miR-306²⁰-DsRed* se observa que la expresión de Abrupt se reprime en las células del compartimento posterior, especialmente en la región de la vena L5 (Figura 28B-B''), indicando que los altos niveles de *miR-306* reprimen la expresión de Abrupt y apoyando que *miR-306* controla la expresión de *abrupt*.

Debido a que los experimentos indicaban que *miR-306* regula a *abrupt*, se decidió analizar la función de *abrupt* en el control del tamaño del ala y del halterio.

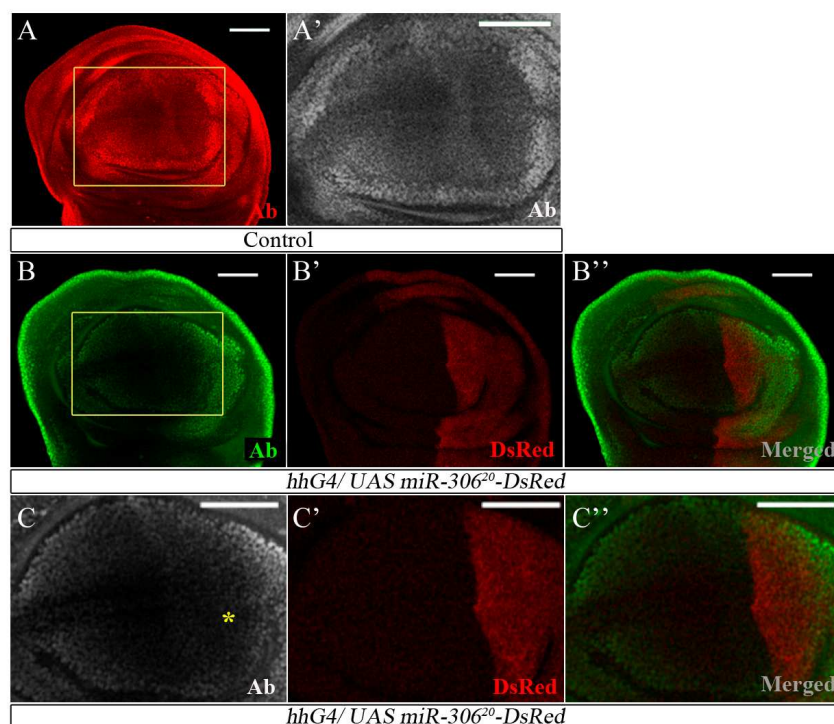


Figura 28: *miR-306* regula la expresión de Abrupt en el disco de ala.

A) Expresión salvaje de Abrupt (rojo) detectada con anticuerpo anti-Abrupt. **A')** Ampliación de la región marcada por recuadro amarillo en (A) mostrando la expresión de Abrupt (blanco). **(B-B'')** Disco *hhG4/UAS miR-306²⁰-DsRed*. **B)** Expresión de Ab (verde). **B')** Expresión de DsRed. **B'')** Superposición de las imágenes (B) y (B'). **(C-C'')** Ampliación de la región marcada por el recuadro amarillo marcado en B. **C)** Expresión de Ab (blanco). El asterisco denota la ausencia de expresión en la región de la vena L5. **C')** Expresión de DsRed. **C'')** Superposición de las imágenes (C) y (C'). Las barras de calibración representan 50 μ m.

2. Función del factor de transcripción Abrupt en el desarrollo de ala y halterio

Para poder comprender el papel que desempeña *miR-306* en el control de la expresión génica de *abrupt* se necesitaba profundizar en el papel de Abrupt en el desarrollo de ala y halterio. Para ello, se analizaron los fenotipos de falta de función de *abrupt* empleando principalmente el alelo hipomorfo *ab¹* (Morgan et al., 1925) y una línea de ARN interferente como se describe en los siguientes apartados.

2.1 Abrupt se requiere funcionalmente para controlar el tamaño del ala y halterio

Ha sido descrito previamente que la falta de función de abrupt produce alas que presentan truncamiento de la vena L5 (Hu et al., 1995; Morgan et al., 1925) y además se ha demostrado que *abrupt* es necesario para el correcto desarrollo del primordio de la vena L5 (Cook et al., 2004). Sin embargo, no estaba descrito ningún efecto en el tamaño de las alas ni de los halterios. Cuando se analizó el fenotipo de los mutantes homocigóticos *ab*¹, no solo se observó el mencionado truncamiento de la vena L5 (Figura 29A), si no que también se apreció una reducción significativa del tamaño del ala del 6,5% cuando se comparó con alas control (Figura 29B). Adicionalmente, se analizaron los tamaños de las alas de otros dos alelos mutantes para abrupt: *ab*^{clu-1} (Vactor et al., 1993) y *ab*^{EY011129}. Las moscas homocigóticas *ab*^{clu-1} presentan una reducción del tamaño del ala del 14% (Figura 29B), del mismo modo las moscas homocigóticas *ab*^{EY011129} presentan una reducción del tamaño del ala del 22% (Figura 29B), indicando que *abrupt* se requiere para el correcto desarrollo del ala. Durante el resto del trabajo se empleó el mutante *ab*¹.

Para comprobar que esta reducción era debida a la falta de función de *ab* se empleó una duplicación genómica de *abrupt* (PBac{ab-GFP.FLAG}, BDSC. #38626) fusionada a GFP. Las alas *ab*¹; *ab-GFP/+* son un 6% más grandes que las alas *ab*¹ (Figura 29C-D), recuperando prácticamente el tamaño de un ala salvaje. Por tanto, la reducción en el ala que se observa en los mutantes *ab*¹ es debido a la falta de expresión de *abrupt*.

Curiosamente, las moscas *ab*¹ presentan una prominente reducción del tamaño de los halterios (Figura 29E-F), los cuales presentan una muesca anormal en la región denominada *capitellum*, confiriéndoles una morfología similar al dibujo de un corazón, por lo que se denominó dicho fenotipo “halterio corazón”. Los porcentajes de penetrancia del fenotipo de “halterio corazón” es un 80% en el caso de las moscas *ab*¹ (Figura 29P).

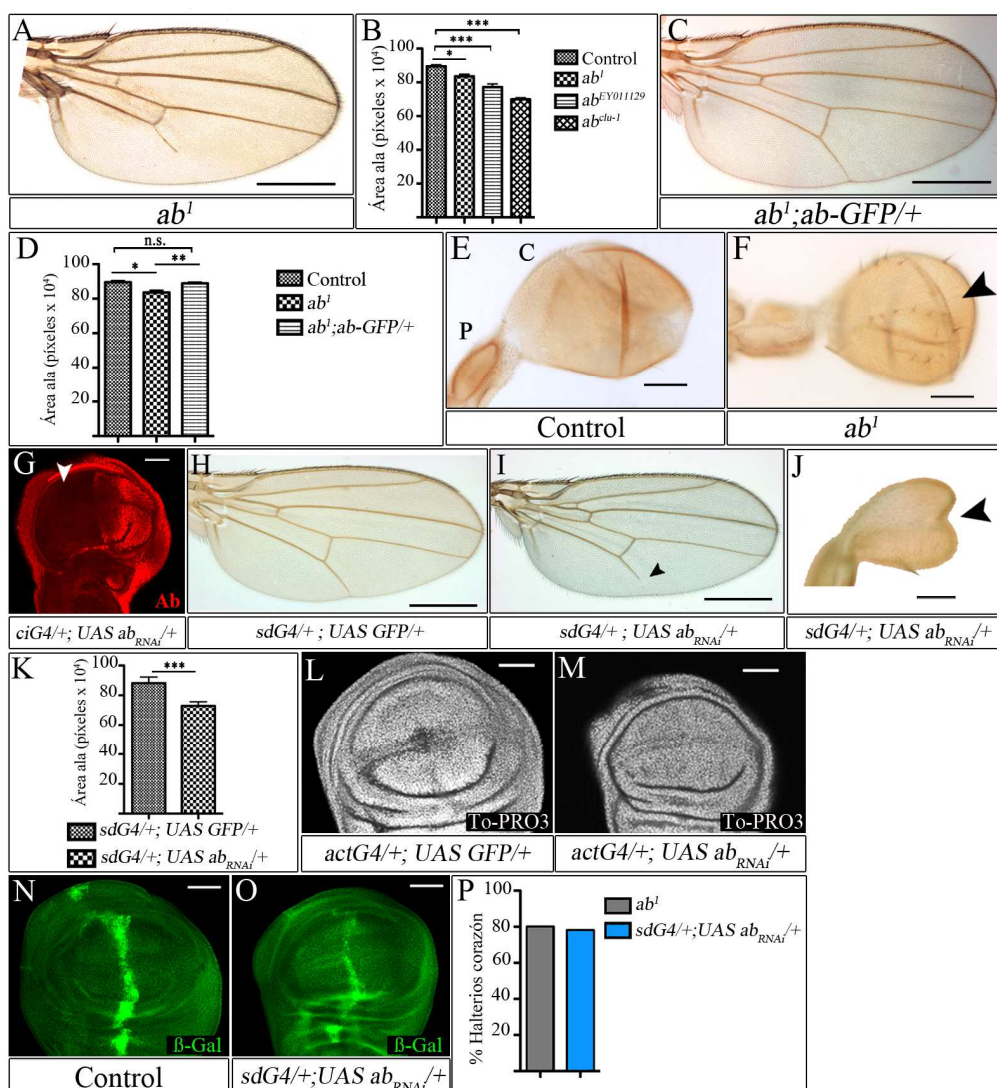


Figura 29: La falta de función de *abrupt* afecta el tamaño del ala y del halterio.

A) Ala *ab*¹. **B)** Gráfica representando el tamaño de las alas de los diferentes mutantes de *abrupt* según los genotipos indicados (n= 20 alas para cada genotipo). **C)** Ala *ab*¹; *ab-GFP/+*, nótese el aumento de tamaño respecto a (A). **D)** Gráfica representando el tamaño de las alas de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). **E)** Halterio salvaje. Debido al enfoque no se puede apreciar el patrón de los pelos. P: *pedicellum* y C: *capitellum*. **F)** Halterio *ab*¹. Nótese la diferencia de tamaño respecto a (E) y la muesca longitudinal (cabeza de flecha). Los pelos son del tipo de un halterio salvaje. **G)** Disco *ciG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*. Nótese la ausencia de expresión de Ab (rojo) en el compartimento anterior (cabeza de flecha) y donde se aprecia notablemente la expresión de *Ab* en el compartimento posterior no solo en los primordios de las venas sino también en la región del “wing pouch”, como en la Figura 28A, página 61. **H)** Ala control *sdG4/+; UAS GFP/+*. **I)** Ala *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* Nótese la diferencia de tamaño respecto a (H) y la vena L5 incompleta (cabeza de flecha). **J)** Halterio *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*. Compárese con (E). La cabeza de flecha indica la posición de la muesca longitudinal como la observada en (F). **K)** Gráfica representando el tamaño de las alas de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). **L)** Disco *actG4/+; UAS GFP/+* mostrando la expresión nuclear de To-PRO3 (blanco). **M)** Disco *actG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* mostrando la expresión de To-PRO3 (blanco). Obsérvese la diferencia de tamaño del disco respecto a (L). **N)** Disco control *sdG4/+; dpp-lacZ/+* mostrando la expresión de β -Galactosidasa (β -Gal, verde). **O)** Disco *sdG4/+; dpp-lacZ/UAS ab_{RNAi}/+* mostrando la expresión de β -Galactosidasa (β -Gal, verde). Obsérvese que el patrón de expresión abarca un área menor que en (M). **P)** Gráfica representando el porcentaje de halterios corazón que aparece en moscas *ab*¹ y *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* (n= 80 y n= 50 moscas para cada genotipo respectivamente). Se empleó como control las moscas *y^{1w}¹¹¹⁸*. Las barras de calibración representan 500 µm para las alas y 50 µm para los discos y halterios. n.s.: no significativo, * 0,01 < p < 0,05, ** 0,001 < p < 0,01 y *** p < 0,001.

Se estudió el fenotipo debido a la inactivación de la expresión de *abrupt* mediante el uso de una línea *UAS ab_{RNAi}*. Se comprobó la efectividad de la inactivación de la expresión de *abrupt* usando *cubitus interruptus Gal4 (ciG4)*, que dirige la expresión en el compartimento anterior del disco de ala, mediante una inmuno-tinción en discos de ala usando el anticuerpo anti-Abrupt. Se observó que en los discos imaginales *ciG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*, los niveles de expresión de Ab disminuían en las células del compartimento anterior (Figura 29G) indicando que la línea *UAS ab_{RNAi}* inactiva eficazmente la expresión de *abrupt*. A continuación, se analizó el fenotipo de las alas y los halterios utilizando la línea *sdG4*. Se observó que las alas de moscas *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* desarrolladas a 29°C tienen su tamaño reducido aproximadamente un 20% respecto a las alas *sdG4/+; UAS GFP/+* como control (Figura 29H-I,K) y también presentaban los halterios con el fenotipo corazón (Figura 29J). Para analizar si la inactivación de *abrupt* produce reducción de tamaño en todo el disco, se estudió el tamaño de los discos de ala de larvas *actG4,UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* donde la expresión de *abrupt* se inactivó bajo el control de la línea *actina Gal4 (actG4)* que dirige la expresión del Gal4 bajo el promotor de *actina* que es ubicuo y se expresa durante todo el desarrollo (Figura 11). Como se puede apreciar, los discos *actG4,UASGFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* (Figura 29M) son más pequeños que los discos control *actG4,UASGFP/+* (Figura 29L) y la disminución afecta de igual manera a todas las regiones del disco. Asimismo, se estudió la reducción del tamaño mediante el análisis de la expresión de Dpp utilizando la construcción *dpp-LacZ* que contiene una región reguladora del gen *dpp* fusionado al gen *LacZ* que dirige su expresión en el disco (Blackman et al., 1991). Como se puede observar, los discos *sdG4/+; dpp-LacZ/UAS ab_{RNAi}* (Figura 29O) tienen su tamaño disminuido y también el patrón de Dpp-LacZ, mostrándose una expresión más débil y en menor número de células que la expresión de LacZ en discos control *dpp-LacZ/+* (Figura 29N), indicando que el patrón de crecimiento de los discos se encuentra afectado.

También, se analizó el efecto en el tamaño de los halterios mediante el uso de la construcción *UAS ab_{RNAi}*. Se observó que la penetrancia del fenotipo “halterio corazón” de las moscas *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* es de un 78% (Figura 29P).

En conjunto, estos resultados indican que *abrupt* es necesario para que tanto el tamaño del ala, como el halterio alcancen su tamaño normal. Dicha función no había sido descrita hasta ahora y se analizará a continuación.

2.1.a *miR-306 y abrupt interaccionan genéticamente*

Los resultados de la respuesta del sensor de *abrupt* a altos niveles de *miR-306* así como los resultados del análisis de los niveles de Abrupt en condiciones de sobre-expresión de *miR-306* sugieren fuertemente que *abrupt* está directamente controlado por *miR-306*. Por ello, a continuación se estudió la interacción genética entre *miR-306* y *abrupt*. Primero se analizó el tamaño de las alas *ab¹/+* y de las alas *miR-306-79-9b-KO/+*, y se encontró que en ambos casos las alas de estas moscas no producen una reducción de tamaño (datos no mostrados). Para estudiar la interacción genética se obtuvieron moscas *ab¹/+; miR-306-79-9b-KO/+*, se analizó el tamaño de las alas y se compararon con los tamaños de las alas *ab¹* homocigóticas. En esta combinación genética, *ab¹/+; miR-306-79-9b-KO/+*, si *miR-306* estuviera regulando negativamente la expresión de *ab*, se esperaría que el alelo salvaje de *miR-306* inactivara o disminuyese la expresión del alelo salvaje de *ab* y, por tanto, el tamaño de las alas *ab¹/+; miR-306-79-9b-KO/+* resultaría similar al de las alas *ab¹* homocigóticas. Como se puede observar en

la Figura 30, las alas $ab^1/+; miR-306-79-9b-KO/+$ son de tamaño similar a las alas ab^1 homocigóticas.

Este resultado sugiere, de nuevo, que *miR-306* regula la expresión de *abrupt* y lo hace para inhibir o mantener su expresión para controlar el tamaño de las alas.

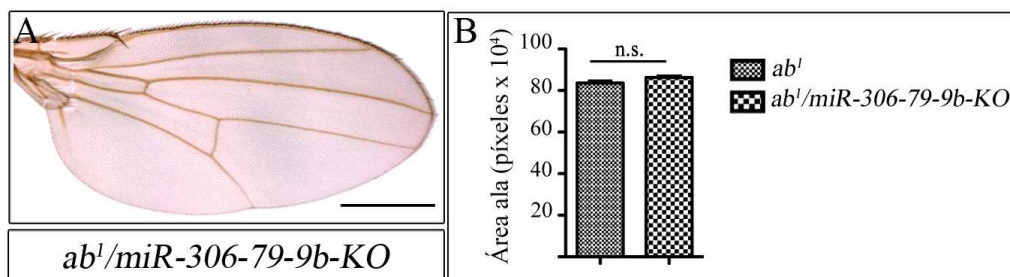


Figura 30: Interacción genética entre *miR-306* y *abrupt*.

A) Ala $ab^1/miR-306-79-9b-KO$. **B)** Gráfica representando el tamaño de las alas ab^1 versus alas $ab^1/miR-306-79-9b-KO$. Nótese que el tamaño de las alas es similar debido a la interacción entre *miR-306* y su diana *abrupt* (ver texto) (n=20 alas para cada genotipo). La barra de calibración representa 500 μm . n.s.: no significativo.

2.2 La inactivación de *abrupt* en el halterio afecta a su tamaño

El fenotipo observado en moscas donde la función de *abrupt* está inactivada y que se denominó “halterio corazón” sugería que *abrupt* podría estar influyendo en el control del tamaño preferencialmente de uno de los compartimentos ya que parecía que el surco se formaba en la mitad longitudinal del halterio. Aunque los bordes del compartimento en el halterio no están muy bien definidos, existen indicios como en el caso de los compartimentos anterior y posterior, y se estima que corresponden aproximadamente con la mitad longitudinal del halterio (Gonzalez-Gaitan et al., 1990). En el caso de los territorios correspondientes a los compartimentos dorsal y ventral del halterio se estimaron por la posición del grupo de los pelos del *capitellum* del halterio (Cole & Palka, 1982).

Para analizar si los compartimentos anterior y posterior del halterio se encuentran afectados, se determinaron *de visu* los compartimentos anterior y posterior del halterio, utilizando las líneas de moscas transgénicas DsRed: Ptc^{PyR68} (de ahora en adelante denominada *ptc-DsRed*) (Akimoto et al., 2005) que se expresa en la células inmediatamente anteriores al borde Antero-Posterior y hh^{PyR215} (de ahora en adelante *hh-DsRed*) (Akimoto et al., 2005) que se expresa en el compartimento posterior. En los discos de halterio, la expresión de *ptc-DsRed* y de *hh-DsRed* coincide con la expresión de *Ptc* y *Hh* (Figura 32A-A', B-B'). En los halterios, la expresión de *ptc-DsRed* conforma un anillo en el *capitellum*, (Figura 31A-A'') y que presuntivamente corresponde con el borde Antero-Posterior del halterio. Por otro lado, la expresión de *hh-DsRed* se muestra sólo en una región del *capitellum* y que presuntivamente corresponde al compartimento posterior del halterio (Figura 31B-B''). Como se puede observar, el territorio que comprende el compartimento posterior es más pequeño que el compartimento anterior y ocupa aproximadamente un 30% del tamaño total del halterio. Para poder identificar con más detalle los límites y la extensión de los compartimentos del halterio, se generaron moscas *ptc-DsRed; hh-DsRed*. Se observó que la expresión en anillo de *ptc-DsRed* es adyacente a la expresión de *hh-DsRed* (Figura 31C-C'') y, por tanto, se pudo definir con mayor precisión los límites del compartimento posterior, permitiendo afirmar que la pequeña

porción dentro del anillo de *ptc*-DsRed, definida por la expresión de *hh*-DsRed, corresponde a todo el compartimento posterior del halterio.

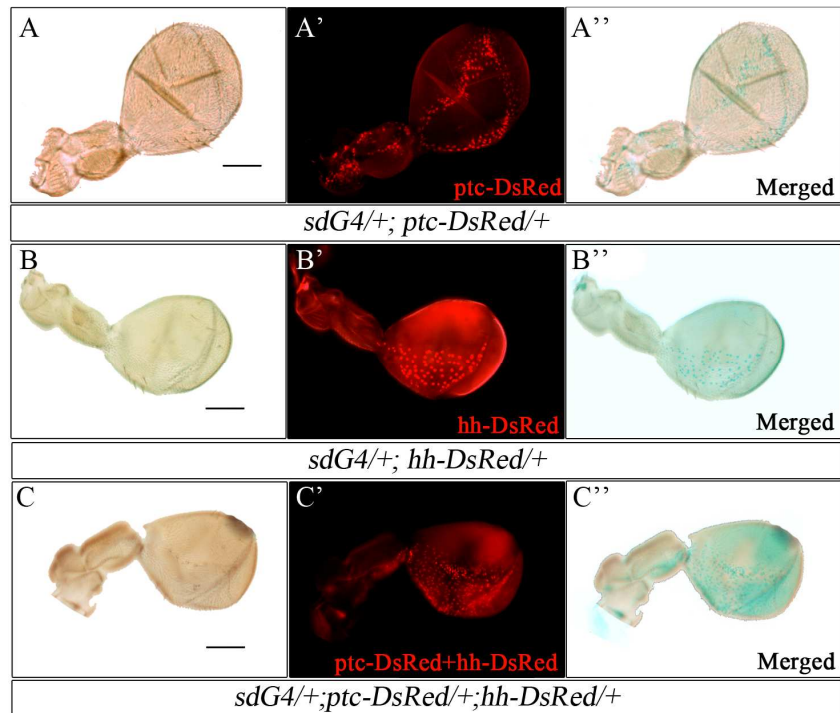


Figura 31: Expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed en el halterio de la mosca.

(A-A'') Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/+*. **A)** Halterio, nótese la localización de los pelos en el *capitellum*. **A')** Expresión de *ptc*-DsRed (rojo). **A'')** Superposición de las imágenes (A') y (A''). Compárese la posición de la expresión *ptc*-DsRed (azul oscuro) respecto a los pelos que presenta el halterio indicando que estos dos grupos de pelos se encuentran localizados en anterior. **(B-B'')** Halterio *sdG4/+; hh-DsRed/+*. **B)** Halterio, nótese la localización de los pelos en el *capitellum* similar a (A). **B')** Expresión de *hh*-DsRed (rojo). **B'')** Superposición de las imágenes (B') y (B''). Compárese la posición de la expresión *ptc*-DsRed (azul oscuro) respecto a los pelos que presenta el halterio resaltando que los grupos de pelos no coinciden con la expresión del reportero *hh*-DsRed. **(C-C'')** Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/+; hh-DsRed/+*. **C)** Halterio, nótese la localización de los pelos de manera similar a (A) y (B). **C')** Expresión conjunta de los dos reporteros *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed (azul oscuro). Compárese con las expresiones en (A') y (B'). El anillo delimitado por la expresión de *ptc*-DsRed es complementario a la expresión de *hh*-DsRed. **C'')** Superposición de las imágenes (C) y (C').

A continuación, se analizaron los discos de ala y halterio y los halterios *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS ab_{RNAi}/+* y *sdG4/+; hh-DsRed/ UAS ab_{RNAi}* para poder definir el fenotipo de los halterios mutantes para *abrupt*. Los discos de ala y halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS ab_{RNAi}/+* y *sdG4/+; hh-DsRed/ UAS ab_{RNAi}* presentan expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed respectivamente como ocurre con los discos control (Figura 32C-C', D-D'). Teniendo en cuenta que las regiones de los "pouch" del halterio de falta de función son más pequeñas, los resultados indican que ya en las células del disco imaginal existe un defecto de crecimiento proporcional tanto en el compartimento anterior, como en el posterior.

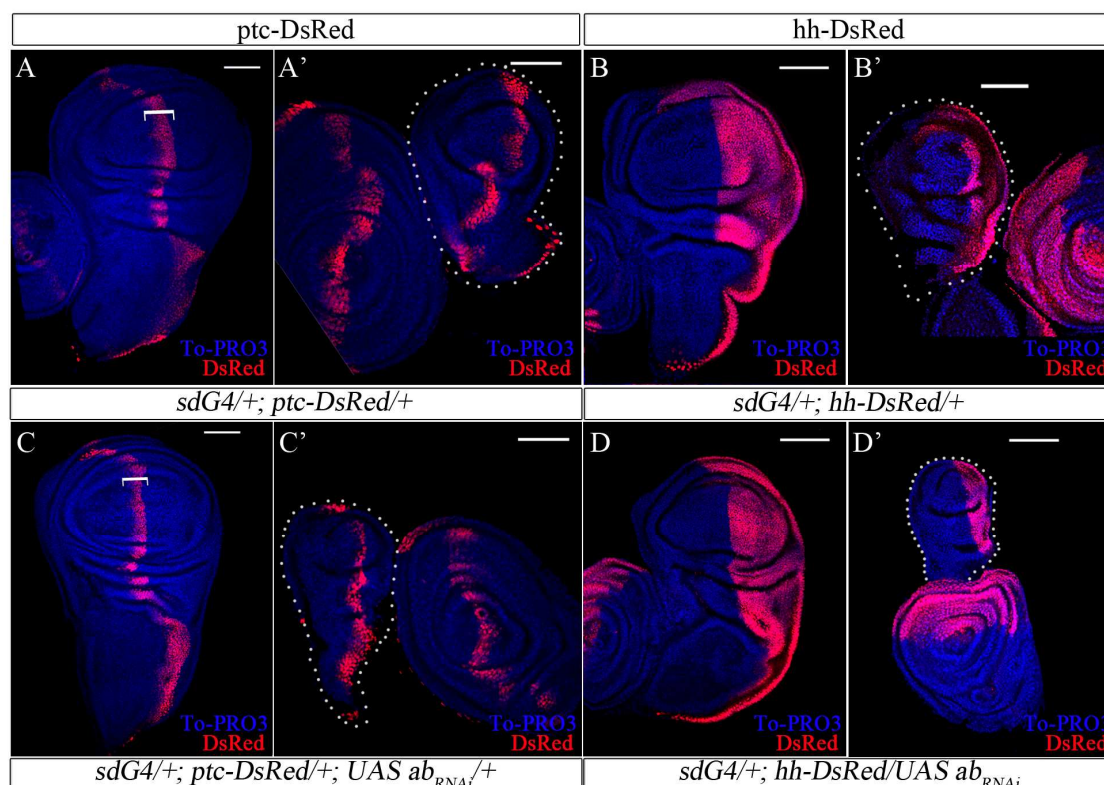


Figura 32: Efecto de la falta de función de *abrupt* en la expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed en los discos de ala y halterio.

(A-A') Expresión de *ptc*-DsRed (rojo) en *sdG4/+; ptc-DsRed/CyO* en el disco de ala (A) y de halterio (bordeado en blanco) (A'). (B-B') Expresión de *hh*-DsRed (rojo) en *sdG4/+; hh-DsRed/TM6B* en el disco de ala (B) y de halterio (bordeado en blanco) (B'). (C-C') Expresión de *ptc*-DsRed (rojo) en *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS ab_{RNAi}/+* en el disco de ala (C). Obsérvese la menor anchura de la expresión del reportero respecto a (A). (C') Disco de halterio (bordeado en blanco). Nótese la expresión similar a (A'), sin embargo se observa una reducción general de tamaño del "pouch". (D-D') Expresión de *hh*-DsRed (rojo) en *sdG4/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* en el disco de ala (D) y en el halterio (bordeado en blanco) (D'). Nótese la expresión similar a (B'), sin embargo se aprecia una reducción general del tamaño del "pouch". En azul se muestra la expresión nuclear del marcador To-PRO3. Las barras de calibración representan 50 μ m.

Se analizó la expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed en el adulto. Los halterios *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS ab_{RNAi}/+* (Figura 33C) muestran disminución del número de células que expresan *ptc*-DsRed cuando se compara con halterios de moscas control *ptc-DsRed* (Figura 33A). Por otro lado, en los halterios *sdG4/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* (Figura 33D) no se aprecia apenas expresión de *hh*-DsRed respecto a halterios control (Figura 33B). En comparación con los halterios control, tanto la expresión de *ptc*-DsRed como de *hh*-DsRed está afectada. Los halterios son más pequeños e indica que tanto el compartimento anterior como el posterior están afectados, aunque en el caso del compartimento posterior es más visible el efecto debido a que tan solo ocupa aproximadamente un 30% del tamaño total del halterio. Curiosamente en estos halterios, *sdG4/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}*, la expresión de *hh*-Dsred está muy afectada y esto no ocurre en el disco de halterio, donde la expresión es todavía apreciable. Por tanto, se podría pensar que el fenotipo del "halterio corazón" puede estar ocurriendo fundamentalmente durante el periodo pupal.

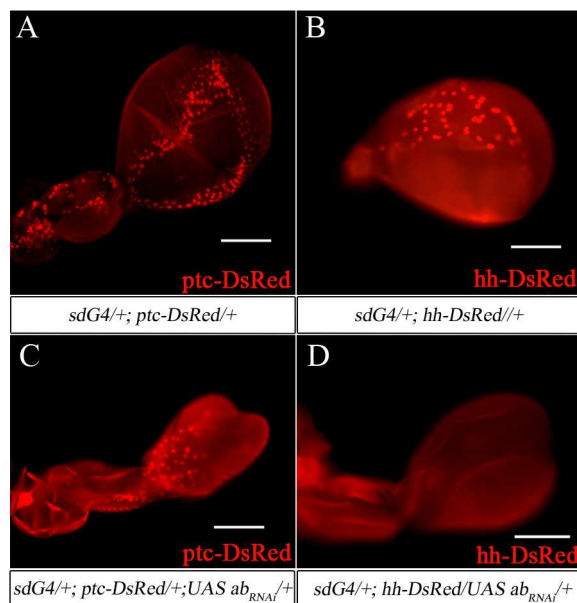


Figura 33: Efecto de la inactivación de *abrupt* en la expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed en los halterios.

A) Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/+* mostrando la expresión de *ptc*-DsRed (rojo). **B)** Halterio *sdG4/+; hh-DsRed/+* mostrando la expresión de *hh*-DsRed (rojo). **C)** Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS *ab*_{RNAi}/+* mostrando la expresión de *ptc*-DsRed (rojo). Compárese con (A) y obsérvese la disrupción del patrón de expresión debido a la disminución de tamaño del halterio. **D)** Halterio *sdG4/+; hh-DsRed/UAS *ab*_{RNAi}/+* mostrando una débil expresión de *hh*-DsRed (rojo). Compárese con (B) y obsérvese la casi completa ausencia de expresión de *hh*-DsRed debido a la disminución del tamaño del halterio. Las barras de calibración representan 50 μm.

Asimismo, se hizo uso de mutaciones en el gen *Ubx* que se encarga de otorgar la identidad de halterio. En el gen *Ubx* existen las regiones cis-reguladoras denominadas *bx* (*bithorax*) y *pbx* (*postbithorax*) que dirigen la expresión de *Ubx* en los compartimentos anterior y posterior, respectivamente, del halterio. Se utilizaron mutaciones en estas secuencias reguladoras, en concreto *bx*³ y *pbx*¹ (Bender et al., 1983), de modo que en la combinación alélica *bx*³/*Ubx*¹³⁰ se observa una transformación del compartimento anterior del halterio hacia compartimento anterior del ala, quedando el compartimento posterior del halterio sin transformar (Figura 34A). Por el contrario, la combinación alélica *pbx*¹/*Ubx*¹³⁰, resulta en la transformación de halterio hacia ala en el compartimento posterior y el anterior permanece sin transformar (Figura 34B) (Bender et al., 1983; Casanova et al., 1985). Siguiendo esta línea de razonamiento, se quiso analizar si la falta de función de *abrupt* afecta a los fenotipos de las combinaciones mutantes de *Ubx* descritas, *bx*³/*Ubx*¹³⁰ y *pbx*¹/*Ubx*¹³⁰. Cuando se analizaron las moscas mutantes *ab*¹; *bx*³/*Ubx*¹³⁰ se observó que presentan transformación de halterio hacia el compartimento anterior del ala (Figura 34C), indicando que en *ab*¹ las células del compartimento anterior de halterio pueden transformarse hacia ala, sin embargo puede apreciarse cómo el área de tejido transformado es menor que en halterios control *bx*³/*Ubx*¹³⁰. En el caso de los mutantes *ab*¹; *pbx*¹/*Ubx*¹³⁰ también se observa una transformación del compartimento posterior del halterio hacia ala (Figura 34D), sin embargo, el área de tejido transformado es menor si se compara con halterios control *pbx*¹/*Ubx*¹³⁰. Estos resultados concuerdan con lo que se observa con la expresión de *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed, ya que se observa una reducción de tamaño general en el halterio.

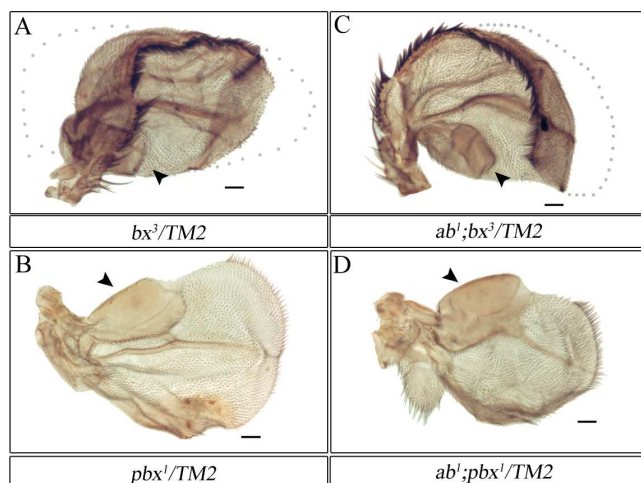


Figura 34: Interacción genética entre *Ultrabithorax (Ubx)* y *abrupt (ab)*-I.

A) Halterio bx^3/Ubx^{130} . El compartimento anterior está transformado hacia ala y la cabeza de flecha señala el compartimento posterior del halterio que no se transforma en tejido de ala. **B)** Halterio pbx^1/Ubx^{130} . El compartimento posterior está transformado hacia ala y la cabeza de flecha señala el compartimento anterior del halterio que no se transforma en tejido de ala. Los puntos en (A) y (B) indican lo que sería el tamaño real de los compartimentos transformados si fuera posible extenderlo para su montaje sin que se rompiera. **C)** Halterio $ab^1; bx^3/Ubx^{130}$. Compárese el tamaño del compartimento anterior transformado hacia ala respecto al tamaño en (A). La cabeza de flecha señala el compartimento posterior del halterio que no se transforma en tejido de ala. **D)** Halterio $ab^1; pbx^1/Ubx^{130}$. Compárese el tamaño del compartimento posterior transformado hacia ala respecto al tamaño en (B). La cabeza de flecha señala el compartimento anterior del halterio que no se transforma en tejido de ala. Las barras de calibración representan 50 μm .

En conjunto, estos resultados indican que el fenotipo de “halterio corazón” que se observa cuando se inactiva la función de *abrupt* es debido a una reducción general del tamaño del halterio y no es debido a un defecto en un compartimento concreto, de la misma forma que la inactivación de *abrupt* afecta de manera general al tamaño del ala y no es debido a un defecto en un compartimento concreto. Además, como se ha mostrado, a pesar de observar transformaciones hacia ala con los mutantes *bx* y *pbx*, se observa que hay una menor transformación tanto en anterior como en posterior, siendo más apreciable en el compartimento posterior debido a que su dominio es más pequeño respecto al anterior.

2.2.a La modulación de los niveles de expresión de *abrupt* no afecta la expresión de *Ubx*

Debido a la disminución del tamaño del halterio observada en moscas con bajos niveles de *abrupt* (Figura 29F), se estudió si esta reducción estaba relacionada con los niveles de expresión del factor de transcripción *Ultrabithorax (Ubx)*. Como ya se mencionó en el apartado 3.2 de la Introducción, la modulación de los niveles de *Ubx* altera el tamaño del halterio: bajos niveles de *Ubx* en el halterio producen su transformación hacia ala, mientras que altos niveles de *Ubx* en el halterio producen disminución de su tamaño. Por tanto, se estudió si, en ausencia de *abrupt*, se estaba produciendo una alteración de los niveles de *Ubx*.

Primero, se analizó la interacción genética entre *Ubx* y *ab*. Para ello, se empleó la mutación nula Ubx^{130} (Kauffman, 1981). Las moscas, $Ubx^{130}/+$ presentan en un 100% de los casos, halterios ligeramente mayores que los halterios salvajes y que además, muestran en la zona del *capitellum* varios pelos morfológicamente similares a los pelos del ala de la zona del hinde (Figura 35A). Al analizar los halterios de las moscas $ab^1; Ubx^{130}/+$ (Figura 35B) se observó que se produce una disminución en el porcentaje de “halterios corazón”, pasando de un 80% observado en los mutantes ab^1 (Figura 35C) a un 31% en $ab^1; Ubx^{130}/+$. Esto sugiere que *Ubx* está involucrado en la generación del fenotipo “halterio corazón” y que quizá, en ausencia de *abrupt*, los niveles de *Ubx* estarían aumentados promoviendo la disminución del tamaño del halterio que se observa.

Asimismo, se estudió la interacción genética entre *abrupt* y *Ubx* empleando la técnica Gal4/UAS mediante el uso de las líneas *sdG4*, *UAS Ubx_{RNAi}* y *UAS ab_{RNAi}*. Los halterios *sdG4/+*; *UAS GFP/+*; *UAS Ubx_{RNAi}/+*, en los cuales se inactiva *Ubx* en la región de *capitellum*, presentan una clara transformación de halterio hacia ala (Figura 35D), aumentándose el tamaño del apéndice y presentando un patrón rudimentario de venas. Sin embargo, los halterios “transformados a alas” de moscas *sdG4/+*; *UAS Ubx_{RNAi}/UAS ab_{RNAi}* (Figura 35E) presentan un tamaño visiblemente menor que los de las moscas *sdG4/+*; *UAS GFP/+*; *UAS Ubx_{RNAi}/+*. De nuevo sugiriendo que *abrupt* regula la expresión de *Ubx*, y que conjuntamente pueden tener un papel en el desarrollo del halterio.

En conjunto, los resultados del análisis de la interacción genética apuntan a una relación entre *abrupt* y *Ubx* necesaria en el crecimiento del halterio, de forma que *abrupt* controla directa o indirectamente, los niveles de expresión de *Ubx*.

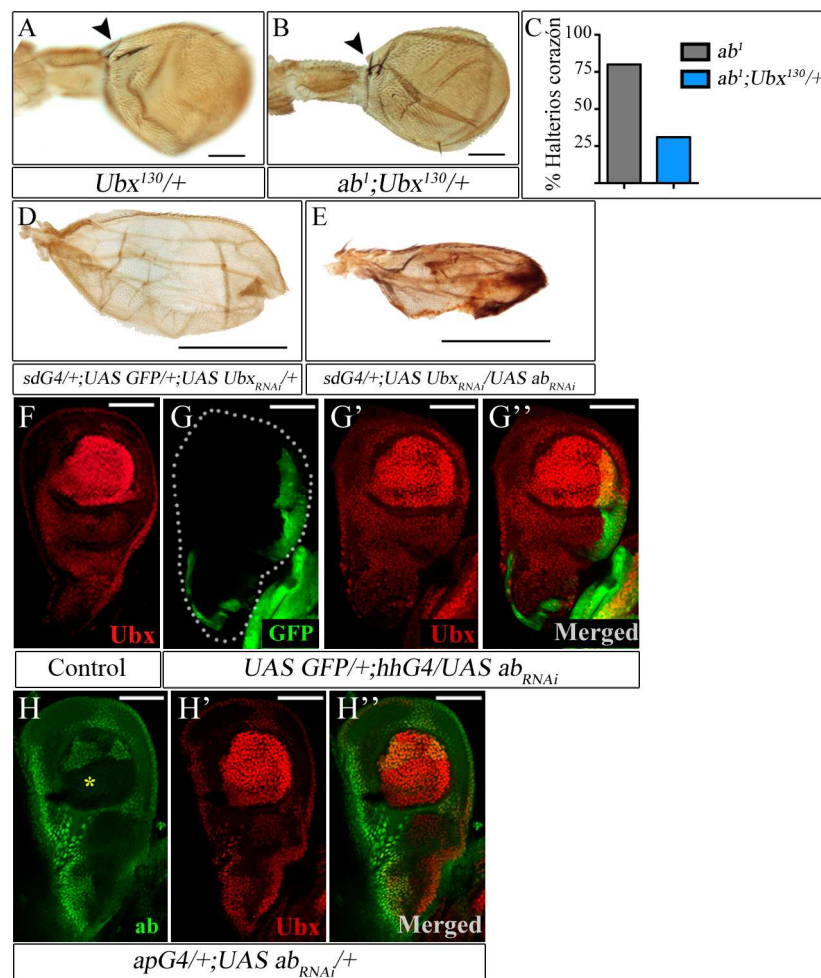


Figura 35: Interacción genética entre *Ultrabithorax* (*Ubx*) y la falta de función de *abrupt* (*ab*)-II.

A) Halterio *Ubx^{130/+}*. La cabeza de flecha señala a los pelos de ala que aparecen en los halterios al inactivar la expresión de *Ubx* en estas condiciones. **B)** Halterio *ab¹; Ubx^{130/+}*. Obsérvese que al comparar con (A) el tamaño de los halterios es similar y la presencia de los pelos característicos de ala. **C)** Gráfica representando el porcentaje de halterios “corazón” de *ab¹* y *ab¹; Ubx^{130/+}* (n=80 y n=70 moscas para cada genotipo respectivamente). **D)** Halterio *sdG4/+*; *UAS GFP/+*; *UAS Ubx_{RNAi}/+* transformado hacia ala. **E)** Halterio *sdG4/+*; *UAS Ubx_{RNAi}/UAS ab_{RNAi}* transformado hacia ala. Nótese la diferencia de tamaño respecto a (D). **F)** Expresión salvaje de *Ubx* (rojo). **(G-G’')** Disco de halterio

UAS GFP/+; hhG4/UAS ab_{RNAi}. **G**) Expresión de GFP (verde) en el compartimento posterior. **G')** Expresión de Ubx (rojo) donde no se aprecia diferencia de los niveles de expresión. **G'')** Superposición de las imágenes (G) y (G'). **(H-H'')** Disco de halterio *apG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*. **H**) Expresión de Abrupt (verde). Nótese la reducción de expresión en el compartimento dorsal donde se está inactivando la expresión de *abrupt* (asterisco). **H')** Expresión de Ubx (rojo) donde no se aprecia variación de los niveles de expresión. **H'')** Superposición de las imágenes (H) y (H'). Las barras de calibración representan 50 μ m para los halterios (A,B) y discos de halterio (F-H''), y 250 μ m para (D-E).

Segundo, se analizó la expresión de Ubx en discos imaginales de ala y halterio con bajos niveles de expresión de *ab*. Se utilizaron las líneas *UAS ab_{RNAi}* en combinación con varias líneas Gal4 tales como *apterous (apG4)*, *scalloped (sdG4)* y *hedgehog (hhG4)* (Figura 11). En los discos imaginales de ala y halterio *apG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* (Figura 35G-G'') ó *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* ó *hhG4/ UAS ab_{RNAi}* (Figura 35H-H'') no se observa expresión aberrante de Ubx (comparado con Figura 35F), sugiriendo que *Abrupt* no regula la expresión de Ubx y que los niveles de Ubx no están alterados ni en los discos de halterio de *ab¹* ni en en los discos de halterio *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*.

Debido a que por un lado los resultados de las interacciones genéticas entre *abrupt* y *Ubx* indicaban una interacción funcional, pero por otro el análisis de la expresión de Ubx en discos donde la función de *abrupt* esta inactivada no indicaba esta relación funcional, se analizó si cuando se sobre-expresan altos niveles de *abrupt* en los discos de ala y halterio, empleando el alelo *UAS ab⁵⁵* (Cook et al., 2004) y la línea *sdGal4*, influye en los niveles de expresión de Ubx. Se observó que los discos de ala y halterio de las larvas crecidas a 29°C presentaban sobre-crecimientos y una fuerte activación de la apoptosis, como se observa por la expresión de C3 (Figura 36C-C''). Además, las alas y los halterios de moscas supervivientes *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/+* crecidas tanto a 29°C como a 25°C están muy reducidos y también presentan sobre-crecimientos (Figura 36A-B). Por tanto, la sobre-expresión de *abrupt* produce sobre-crecimientos en los discos de ala, remarcando la importancia de modular los niveles de expresión de *Abrupt*.

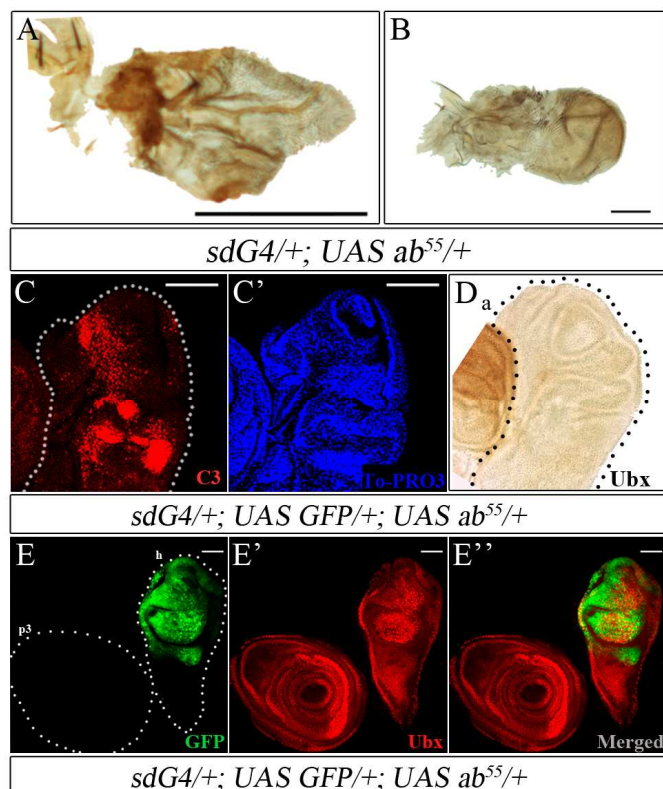


Figura 36: Fenotipos asociados con los altos niveles de abrupt en el ala y el halterio.

A) Ala *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/+*. **B)** Halterio *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/+*. **(C-C')** Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+*. **C)** Expresión de C3 (rojo). **C')** Expresión nuclear de To-PRO3 (azul). **D)** Expresión de Ubx (marrón) en disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+*. El disco de ala (a) está rodeado por los puntos. Nótese que en sobre-expresión de abrupt, no hay expresión ectópica de Ubx en el disco de ala. **(E-E'')** Disco de halterio (h) y pata (p3) *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+*. **E)** Expresión de GFP (verde). Nótese la expresión en el disco de halterio (h) pero no en el disco de pata (p3), debido a que *scalloped* no dirige la expresión en este disco. **E')** Expresión de Ubx (rojo), donde no se aprecia variación de los niveles de Ubx comparado con Figura 35E, página 70. **E'')** Superposición de las imágenes (E) y (E'). Las barras de calibración representan 50 μm.

Se analizaron los niveles de expresión de Ubx en los discos de ala y halterio de larvas *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/+*. Como se puede apreciar en la Figura 36, la expresión de Ubx en el disco de ala se restringe, de la misma forma que ocurre en los discos salvajes, a la membrana peripodial, no observándose expresión de Ubx en el disco propio de ala (Figura 36D). En el disco de halterio no se observa, a pesar de los sobre-crecimientos, variación en los niveles de Ubx (Figura 36E-E'').

Por tanto, aunque los resultados de la interacción genética apuntan a una posible relación entre *Ubx* y *abrupt*, los resultados del análisis de la expresión de Ubx cuando se modulan los niveles de abrupt en los discos imaginales no apoyan esta hipótesis.

2.3 Abrupt controla crecimiento a través del control del tamaño celular.

A continuación, se estudió si la reducción de los apéndices de ala y de halterio debido a la falta de función de *abrupt* se debía o bien a la activación de la apoptosis o bien a un defecto en el tamaño celular. Para ello, se analizó la expresión de C3 como reportero de la activación de la muerte celular y la densidad de tricomas como reportero del tamaño celular. Los discos de ala y halterio *ab¹* y *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* no mostraron expresión de C3 (datos no mostrados) indicando que al menos, hasta tercer estadio larvario, no hay activación de la vía apoptótica. Por otro lado, el análisis de la densidad de tricomas en alas *ab¹* comparado con la densidad de tricomas en alas control aumenta significativamente, un 7%, revelando que la falta de función de *ab* reduce el tamaño celular (Figura 37A,B).

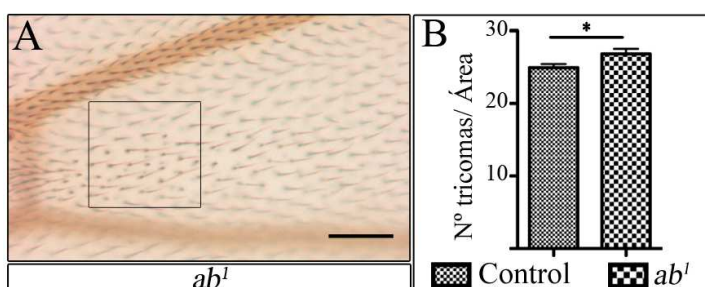


Figura 37: Análisis de la densidad de tricomas en ausencia de *abrupt*.

A) Ala *ab¹* señalando el área (recuadro negro) empleado para la cuantificación de tricomas. **B)** Gráfica representando el número de tricomas por área de *ab¹* respecto a alas control (n=20 alas para cada genotipo). La barra de calibración representa 50 µm para la ampliación de las alas. * 0,01 < p < 0,05.

Por lo tanto, estos resultados indican que la falta de función de *abrupt* no induce muerte celular y la observada reducción del tamaño del ala y del halterio parece estar relacionada con el control que *Abrupt* ejerce sobre el tamaño celular.

2.4 La modulación de los niveles de *abrupt* afecta la progresión del ciclo celular

Dado que los fenotipos que se al modular los niveles de *abrupt* indican defectos en el crecimiento de los discos y en el tamaño celular, se dispuso analizar el ciclo celular. Para ello se emplearon los siguientes reporteros del ciclo celular descritos a continuación. Por un lado, se analizó la expresión de GFP utilizando la construcción Fly-Fucci (Zielke et al., 2014) que contiene la región N-terminal (1-230aa) de la proteína E2F1 fusionado a GFP. Esta región de E2F1 tiene un sitio de unión para la ubiquitin-ligasa CRL4^{Cdt2} de forma que, cuando la célula está en la fase S, CRL4^{Cdt2} interacciona con E2F1 y lo degrada. De esta manera, la expresión de GFP del Fly-Fucci marca las fases G1, G2 y M (Figura 38A, Zielke et al., 2014). Por otro lado, se empleó también la construcción PCNA-EmGFP (Swanhart et al., 2007), un cofactor de la polimerasa δ y el cual es esencial para la replicación de las células, marcando en este caso la fase S del ciclo que se detecta analizando la expresión de GFP (Figura 38C). Por último, también se empleó la Histona 3 fosforilada (PH3) como marcador de mitosis (Figura 38E).

2.4.a Los bajos niveles de expresión de *abrupt* afecta la progresión del ciclo celular

En los discos de ala *ciG4/+; Fly-Fucci-GFP/UAS ab_{RNAi}* en los cuales la expresión de *abrupt* está inactivada en el compartimento anterior de los mismos, se advierte una disminución de la expresión de GFP en el compartimento anterior (Figura 38B-B'') cuando se compara con la expresión de GFP en el compartimento anterior de discos control *Fly-fucci-GFP* (Figura 38A). Esto sugiere que la ausencia de expresión de *abrupt* disminuye la expresión de E2F1 durante las fases G1, G2 y M y que, por tanto, *abrupt* controla el progreso de estas fases.

Por otro lado, la expresión de GFP en discos *enG4/+; PCNA-EmGFP/UAS ab_{RNAi}* en los cuales *abrupt* está inactivada en el compartimento posterior, se encuentra aumentada (Figura 38D-D'') en comparación con la expresión de GFP en el compartimento posterior de discos control *PCNA-EmGFP*. Este resultado indica que, cuando hay bajos niveles de *abrupt*, hay mayor número de células en fase S, por lo que *abrupt* influye en la progresión G1-S.

Por último, se cuantificaron los niveles de PH3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* (Figura 38F) y se compararon con los niveles de PH3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+*. Se observó que hay un aumento significativo de la expresión de PH3 en el "wing pouch" donde se está

inactivando *abrupt*, destacando que hay mayor número de células en fase M cuando hay bajos niveles de *abrupt* (Figura 38G). Curiosamente, en la región del *notum* de los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* el número de células PH3 positivas son similares al número de células PH3 positivas en los discos control *sdG4/+; UAS GFP/+*. Indicando que los cambios observados en la fase de mitosis solo ocurren en el territorio donde se inactivó *abrupt*. Así, ya que se observan cambios tanto en la fase de síntesis como en la de mitosis, se concluye que la falta de función de *abrupt* afecta la progresión del ciclo celular.

En conjunto, el análisis con los reporteros de ciclo celular utilizados, indica que los defectos de crecimiento observados cuando la función de *abrupt* está inactivada, se ven reflejados en la progresión del ciclo celular. En comparación con discos control (*sdG4/+; UAS GFP/+*) la expresión de *Fly-fucci-GFP* (reportero de G1, G2 y M) en los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* disminuye, indicando que las fases G1, G2 y M están afectadas en ausencia de *abrupt*. Sin embargo, la expresión de *PCNA-EmGFP* (reportero de fase S) y la expresión de PH3 (marcador de fase M) aumentan. El aumento de células en fase S podría ser debido a una ralentización de la fase G1, ya que se sabe que cuando el ciclo celular es ralentizado en una sola fase, el resto del ciclo celular acelera su progresión con el fin de compensar el retraso, produciéndose unas células más pequeñas (Neufeld et al., 1998), como también se observa en la falta de función de *abrupt* (Figura 37).

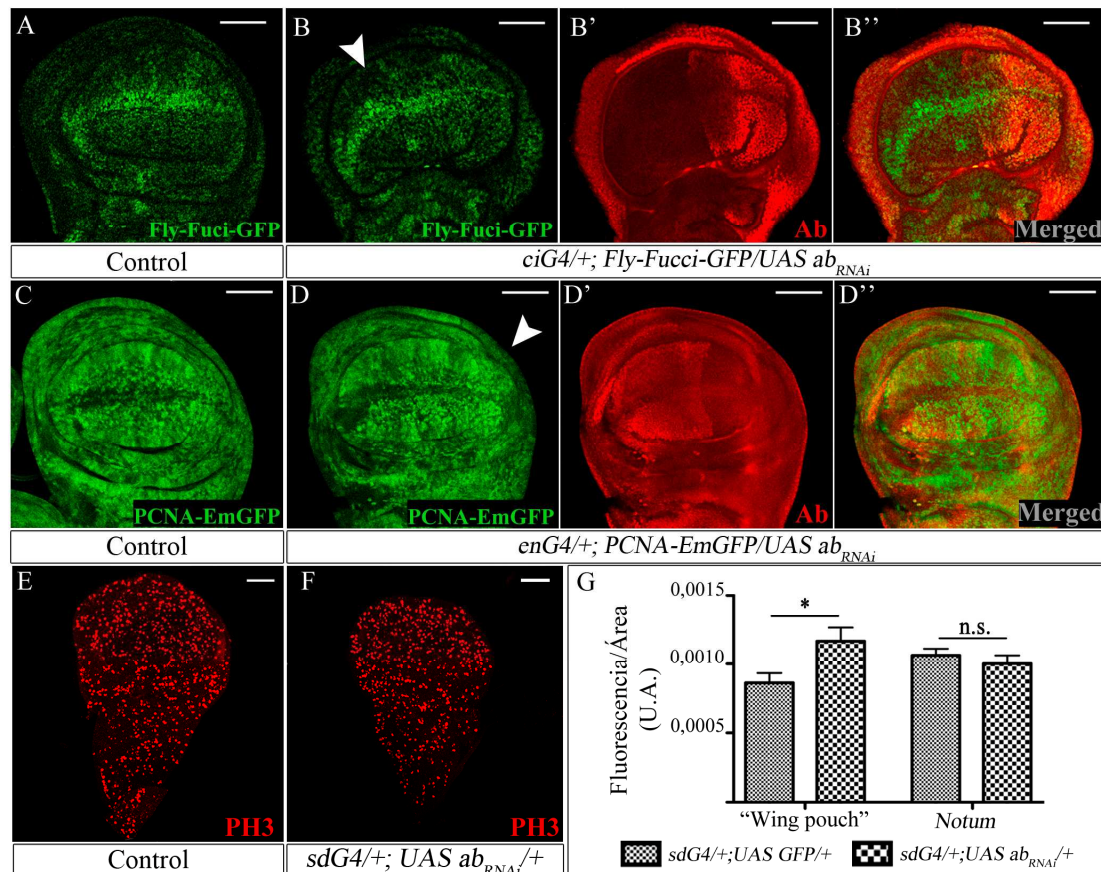


Figura 38: Efecto de la inactivación de *abrupt* en la progresión del ciclo celular.

A) Disco *Fly-Fucci-GFP* mostrando la expresión salvaje de *Fly-Fucci-GFP* (verde). **(B-B'')** Disco *ciG4/+; Fly-Fucci-GFP/UAS ab_{RNAi}/+*. **B)** Expresión de *Fly-Fucci-GFP* (verde), la cabeza de flecha indica la reducción de los niveles de GFP en el compartimento anterior, especialmente fuera del borde D/V, comparado con (A). **B')** Expresión de *Abrupt* (rojo). Nótese la ausencia de expresión en el compartimento anterior, indicando la eficacia de la línea

UAS ab_{RNAi}. **B''**) Superposición de las imágenes (B) y (B'). **C**) Disco *PCNA-EmGFP* mostrando la expresión salvaje de PCNA-EmGFP (verde). **(D-D'')** Disco *enG4/+; PCNA-EmGFP/UAS ab_{RNAi}*. **D**) Expresión de PCNA-EmGFP (verde), la cabeza de flecha indica el aumento de los niveles de GFP en el compartimento posterior comparado con (C). **D')** Expresión de Abrupt (rojo). Nótese la ausencia de expresión en el compartimento posterior. **D'')** Superposición de las imágenes (D) y (D'). **E**) Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+* mostrando la expresión de PH3 (rojo). **F**) Disco de ala *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+* mostrando la expresión de PH3 (rojo). **G**) Gráfica representando la fluorescencia por área de PH3 en la región del disco del "wing pouch" donde se inactiva la expresión de *abrupt* versus la expresión en el *notum* donde *abrupt* se expresa de manera salvaje (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=10 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m. n.s.: no significativo, $p > 0,05$, * $0,01 < p < 0,05$.

2.4.b Los altos niveles de miR-306 afectan la progresión del ciclo celular

Debido a que *abrupt* es una de las dianas de *miR-306* y que además la modulación de los niveles de *miR-306* afecta al tamaño celular y al tamaño de las alas, se decidió comprobar si existía un defecto en la progresión del ciclo celular de los discos de ala con altos niveles de *miR-306*, lo cual implicaría bajos niveles de *abrupt*. Para ello se utilizaron las construcciones Fly-Fucci-GFP (reportero de fases G1, G2 y M ya que su expresión se degrada en fase S, Figura 38A, Zielke et al., 2014) y PCNA-EmGFP (reportero de células en fase S, Figura 38C, Swanhart et al., 2007).

Comparando la expresión de GFP en el compartimento anterior de discos control *Fly-Fucci-GFP* con la expresión de GFP en el compartimento anterior de discos *ciG4/+; Fly-Fucci-GFP/UAS miR-306²⁰-DsRed*, se observa una disminución de los niveles de GFP en dicho compartimento (Figura 39A-A''). Del mismo modo, cuando se compara la expresión de GFP en discos *PCNA-EmGFP* con discos *enG4/+; PCNA-EmGFP/ UAS miR-306²⁰-DsRed*, se observa también una disminución de los niveles de GFP en el compartimento posterior (Figura 39B-B'').

Estos resultados indican que los altos niveles *miR-306* afectan la progresión del ciclo celular de una forma similar a lo que hace inactivación de *abrupt*, ya que en ambas situaciones se observa que la expresión de *Fly-Fucci-GFP* está disminuida, indicando que la fase G1, G2 o M están afectados. Sin embargo, a diferencia de los que ocurre con la inactivación de *abrupt*, la expresión de *PCNA-EmGFP* se encuentra disminuida, lo que quizás podría explicarse por el efecto de otras dianas de *miR-306*.

En conjunto, los resultados del análisis de la falta de función de *abrupt* y la sobre-expresión de *miR-306* en la regulación del ciclo celular, destaca la importancia de mantener los correctos niveles de expresión de *abrupt* para una correcta progresión del ciclo celular.

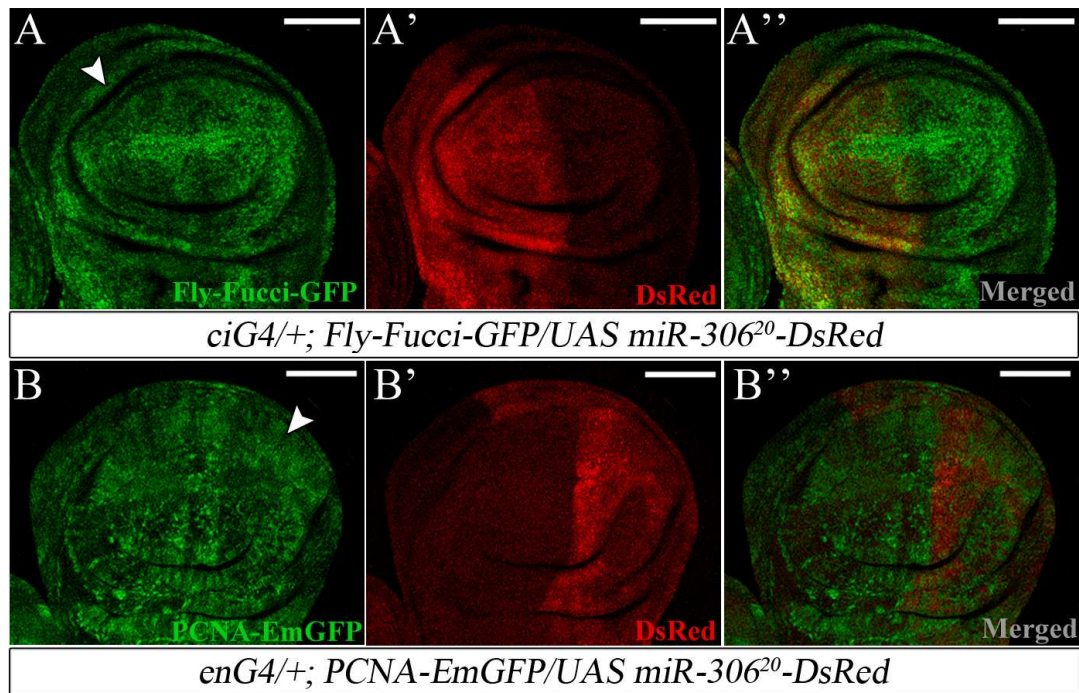


Figura 39: Efecto de los altos niveles de *miR-306* en la progresión del ciclo celular.

(A-A'') Disco *ciG4/+; Fly-Fucci-GFP/UAS miR-306²⁰-DsRed*. **A)** Expresión de Fly-Fucci-GFP (verde). La cabeza de flecha indica la reducción de los niveles de GFP en el compartimento anterior, especialmente fuera del borde D/V, similar a lo que ocurre con la inactivación de *abrupt*. (Comparar con la Figura 38A, página 74). **A')** Expresión de DsRed en el compartimento anterior. **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). **(B-B'')** Disco *enG4/+; PCNA-EmGFP/UAS miR-306²⁰-DsRed*. **B)** Expresión de PCNA-EmGFP (verde), la cabeza de flecha indica la reducción de GFP en el compartimento posterior. (Comparar con Figura 38C, página 74). Las barras de calibración representan 50 μ m.

2.5 Abrupt controla tamaño a través de sus dianas CycD-Cdk4, CycE-Cdk2

Conociendo que tanto altos como bajos niveles de expresión de *abrupt* afecta el crecimiento de alas y de halterios, se decidió estudiar las posibles dianas a través de las cuales este factor de transcripción podría estar ejerciendo su efecto.

A pesar de que muchas de las vías de señalización conocidas, como son entre otras, la vía de la insulina, la de la ecdysona o la de Notch afectan el crecimiento a través de sus múltiples factores e interactores, el final de todas estas vías converge en el control de la proliferación a través de la progresión del ciclo celular.

Recientemente, Turkel *et al.* realizaron una búsqueda de genes afectados por la sobre-expresión de *abrupt* mediante experimentos tanto de microarrays como de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) de los discos de ojo-antena (Turkel et al., 2013). Precisamente, entre los candidatos se observó que Abrupt se encontraba unido a la región reguladora del proto-oncogén *diminutive* o *dMyc*, un factor de transcripción involucrado en múltiples procesos como la proliferación, apoptosis o tumorigénesis (revisado en Gallant, 2013). Asimismo, se observó que *abrupt* se unía a las regiones reguladoras de dos genes implicados directamente en el ciclo celular. Estos genes son: *Cdk4*, que codifica una quinasa dependiente de Ciclina que coopera con la Ciclina D en el ingreso al ciclo celular (Datar et al.,

2000; Meyer et al., 2000), y *cdc2c* o *Cdk2*, que codifica una quinasa dependiente de Ciclina 2 que entre otras, coopera con la Ciclina E promoviendo el paso de G1 a S en el ciclo (Knoblich et al., 1994). Además, el análisis de RNA-seq descubrió que los perfiles de expresión de los tres genes estaban aumentados en sobre-expresión de *abrupt* (Tukel et al., 2013). Por lo que se decidió estudiar la interacción genética entre *abrupt*, *CycD-Cdk4*, *CycE-Cdk2* y *dMyc* a través del análisis los tamaños de las alas y halterios.

2.5.a Los altos niveles de *CycD-Cdk4* y de *CycE* rescatan la reducción del tamaño del halterio producida por la inactivación de *abrupt*

Dado que *Cdk4* se asocia con la Ciclina D para finalmente activar al complejo Ciclina E-*Cdk2* y promover la progresión de G1 a S en el ciclo, se analizó el efecto de la sobre-expresión de cada uno de estos complejos por separado en los halterios de las moscas *sdG4/+; UAS ab_{RNAi}/+*, que presentan una disminución del tamaño del halterio (Figura 29J). Para analizar el efecto de *CycD-Cdk4* y de *CycE-Cdk2* en el tamaño del halterio se usaron como reporteros las construcciones *ptc-DsRed* y *hh-DsRed*.

En los halterios de moscas *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycD-Cdk4* y en los de moscas *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+; hh-DsRed/+* el tamaño de los halterios es similar al de los halterios salvajes y las expresiones de *ptc-DsRed* y la de *hh-DsRed* no parecían estar afectadas (Figura 40A-B). En los halterios de las moscas *sdG4/+; ptc-DsRed /UAS CycD-Cdk4; UAS ab_{RNAi}/+* y moscas *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* se aprecia un aumento tanto del tamaño de los halterios como de la expresión de tanto *ptc-DsRed* y de *hh-DsRed* (Figura 40C-D) cuando se compara con halterios *sdG4/+; ptc-DsRed/+; UAS ab_{RNAi}/+* y *sdG4/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* (Figura 33C-D). Estos resultados indican que el tamaño de los compartimentos anterior y posterior está rescatado en presencia de altos niveles de *CycD-Cdk4*. Además, se observó que la frecuencia de “halterios corazón” en moscas *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+; UAS ab_{RNAi}/+* disminuye a un 22% frente al 58% encontrado en moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* reforzando que hay un rescate en el tamaño del halterio debido a los altos niveles de *CycD-Cdk4* (Figura 40I).

Los halterios *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycE* y *sdG4/+; UAS CycE/+; hh-DsRed/+*, ambos con altos niveles de Ciclina E (el “partner” de *Cdk2*), tienen un tamaño similar a los halterios control y, además, expresan niveles similares de *DsRed* comparados con halterios control *ptc-DsRed* y *hh-DsRed* (Figura 40E-F). Cuando se combina la sobre-expresión de la *CycE* con la inactivación de *abrupt*, los halterios de moscas *sdG4/+; ptc-Dsred/UAS CycE; UAS ab_{RNAi}/+* y *sdG4/+; UAS CycE/+; hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* revelan una mayor expresión de *DsRed* tanto del reportero *ptc-DsRed* como del reportero *hh-DsRed* (Figura 40G-H), indicando que hay un rescate de tamaño en los compartimentos del halterio (comparar con Figura 33C-D).

Estos resultados indican que los altos niveles de *CycD* y *CycE* rescatan el fenotipo de inactivación de *abrupt* y que, por tanto, *abrupt* podría estar controlando la expresión de estos genes.

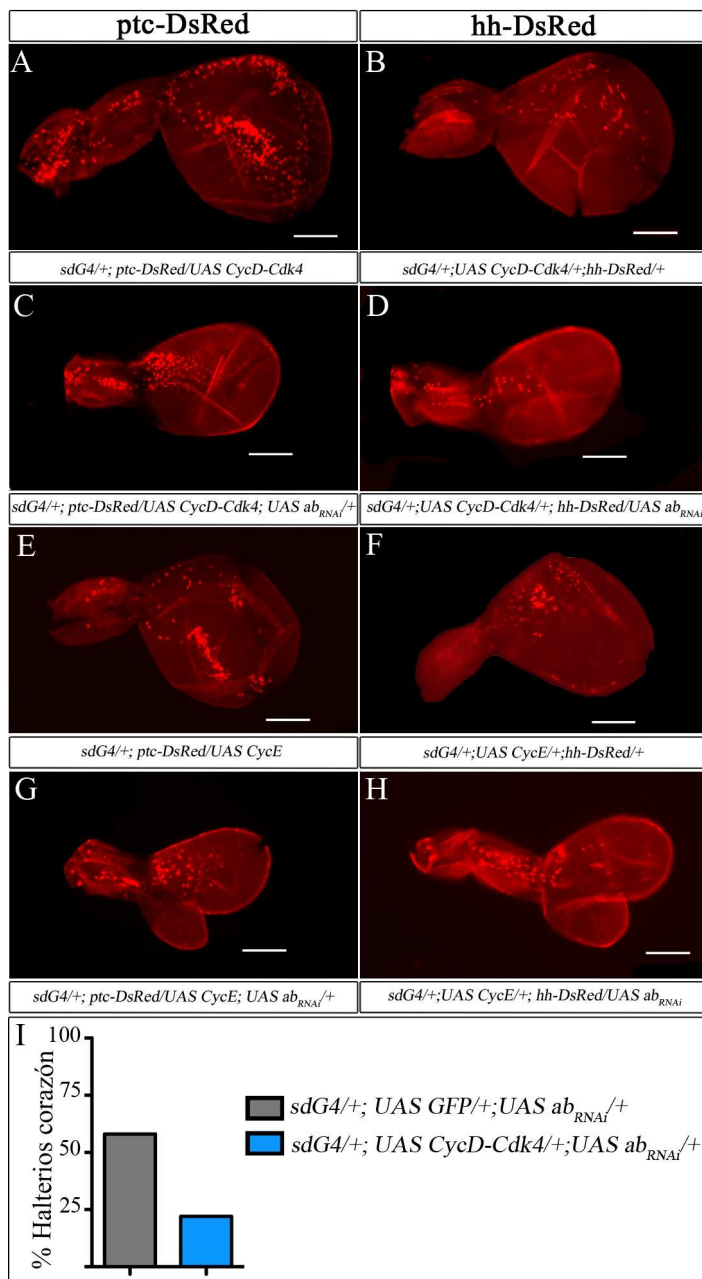


Figura 40: Efecto de los altos niveles de CycD-Cdk4 y de CycE en la reducción de tamaño del halterio producida por la inactivación de *abrupt*.

A) Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycD-Cdk4* mostrando la expresión de ptc-DsRed (rojo). **B)** Halterio *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+;hh-DsRed/+* mostrando la expresión de hh-DsRed (rojo). **C)** Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycD-Cdk4; UAS ab_{RNAi}/+* mostrando la expresión de ptc-DsRed (rojo). Nótese el rescate de tamaño (y la desaparición de la muesca) del halterio respecto al tamaño y la expresión de ptc-DsRed mostrados en la Figura 33C debido a la inactivación de *abrupt*. **D)** Halterio *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+;hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* mostrando la expresión de hh-DsRed (rojo). Nótese el rescate de tamaño (y la ausencia de la muesca típica) y la expresión de hh-DsRed respecto al tamaño y la expresión mostrados en Figura 33D. **E)** Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycE* mostrando la expresión de ptc-DsRed. **F)** Halterio control *sdG4/+; UAS CycE/+;hh-DsRed/+* mostrando la expresión de hh-DsRed (rojo). **G)** Halterio *sdG4/+; ptc-DsRed/UAS CycE; UAS ab_{RNAi}/+* mostrando la expresión de ptc-DsRed (rojo). Nótese el rescate en la expresión de ptc-DsRed en comparación con la expresión cuando solo se inactiva *abrupt* mostrado en la Figura 33C, página 68. Sin embargo, el fenotipo “halterio corazón” todavía sigue presente. **H)** Halterio *sdG4/+; UAS CycE/+;hh-DsRed/UAS ab_{RNAi}* mostrando la expresión de hh-DsRed (rojo). Nótese el rescate en la expresión de hh-DsRed en comparación con la expresión cuando solo se inactiva *abrupt* mostrado en la Figura 33D, página 68. El fenotipo “halterio corazón” todavía está presente. **I)** Gráfica representando el porcentaje del fenotipo “halterios corazón” en los halterios *sdG4/+; UAS GFP/+;UAS ab_{RNAi}/+* versus *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+;UAS ab_{RNAi}/+* (n=90 y n=104 moscas de cada genotipo respectivamente). Se observa una disminución en el número de halterios con fenotipo corazón cuando se sobre-expresa la CycD-Cdk4 concomitantemente con la inactivación de *abrupt*. Las barras de calibración representan 50 μ m.

2.5.b Los altos niveles de CycD-Cdk4, de CycE-Cdk2, pero no de dMyc rescatan la reducción del tamaño del ala producida por la inactivación de *abrupt*

Una vez observado que los altos niveles tanto de CycD-Cdk4 como de CycE-Cdk2 rescatan el tamaño de los halterios con bajos niveles de *abrupt*, se procedió a comprobar si esto ocurría

del mismo modo con el tamaño de las alas adultas, ya que las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+* también están reducidas (Figura 41A). Para ello se combinó la sobre-expresión de CycD-Cdk4, de CycE y de dMyc, con la falta de función de *ab* y se analizó el tamaño de las alas.

Por un lado, a pesar de que la sobre-expresión de CycD-Cdk4 a 25°C reduce el tamaño de las alas (Apéndice 3, Figura A3. 3A) cuando se combina la sobre-expresión de CycD-Cdk4 con la inactivación de *ab* en moscas, *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+; UAS ab^{RNAi}/+* (Figura 41B), se observa que las alas son un 11% más grandes que las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+*, indicando que hay un rescate en el tamaño de las alas (Figura 41E).

Por otro lado, la sobre-expresión de CycE a 25°C produce un tamaño similar a las alas salvajes (Apéndice 3, Figura A3. 3A). Cuando se combina la sobre-expresión de CycE con la inactivación de *abrupt*, *sdG4/+; UAS CycE/+; UAS ab^{RNAi}/+* (Figura 41C), son un 17% más grandes que las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+* (Figura 41D), indicando que la sobre-expresión de CycE rescata la reducción de tamaño producida por la falta de *ab*. Además del rescate en tamaño, también se observa un aumento en la longitud de la vena L5 que se encuentra truncada en las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+* (Apéndice 3, Figura A3. 3D). Estos resultados concuerdan con los observados al inactivar *dacapo*, inhibidor de CycE-Cdk2, para impedir la progresión G1-S del ciclo. Las alas *sdG4/+; UAS ab^{RNAi}/UAS dap^{RNAi}* (Figura 41E) son un 23% más grandes que las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+* (Figura 41F) a 29°C, indicando que se produce un rescate del tamaño observado en la inactivación de *abrupt*. Además, también se observó un rescate en la longitud de la vena L5 como se observó con la sobre-expresión de CycE (Apéndice 3, Figura A3. 3D). Dado que *dacapo* no es una diana predicha para *abrupt*, los resultados observados serían el resultado indirecto de impedir que *dacapo* ejerza su papel represor sobre CycE-Cdk2, aumentando los niveles de este complejo y, por tanto, produciendo el rescate.

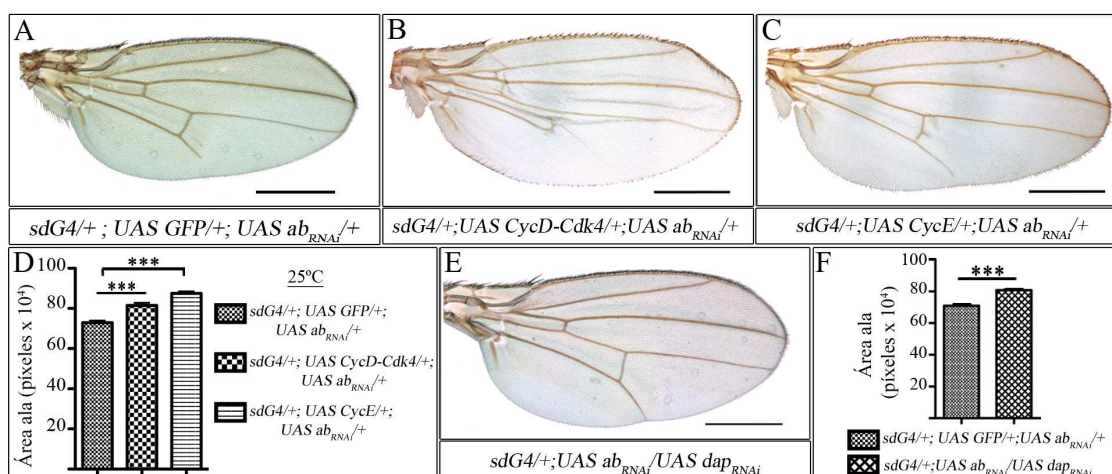


Figura 41: La sobre-expresión de CycD-Cdk4, CycE y la inactivación de *dacapo* rescatan la reducción del tamaño del ala producido por la inactivación de *abrupt*

A) Ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab^{RNAi}/+*. **B)** Ala *sdG4/+; UAS CycD-Cdk4/+; UAS ab^{RNAi}/+*. **C)** Ala *sdG4/+; UAS CycE/+; UAS ab^{RNAi}/+*. **D)** Ala *sdG4/+; UAS ab^{RNAi}/UAS dap^{RNAi}*. **E)** Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas de los genotipos indicados (n=20 alas para cada genotipo). Las barras de calibración representan 500 μ m. n.s.: no significativo, *** p<0,001.

Por último, los experimentos para el análisis del rescate con altos niveles de dMyc fueron llevados a cabo a 25°C, ya que a 29°C las moscas *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab^{RNAi}/+* mueren en

estadio de pupa diferenciada (Figura A3. 3B-C). A 25°C, las alas de las moscas *sdG4/+; UAS GFP/UAS dMyc*, presentan un tamaño similar a las alas control (Apéndice 3, Figura A3. 3A). Sin embargo, cuando se combina la sobre-expresión de dMyc con la inactivación de *abrupt*, no se observa un cambio significativo en el tamaño de las alas *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab_{RNAi}/+* revelando que la sobre-expresión de dMyc no es suficiente para rescatar el tamaño de las alas de falta de función de *abrupt* (Figura 42A-B). Además, dado que la sobre-expresión de dMyc no produce reducción de tamaño por sí mismo a 25°C (Apéndice 3 Figura A3. 3A), estos resultados podrían estar apuntando a que a su vez dMyc requiere de *abrupt* para ejercer su función.

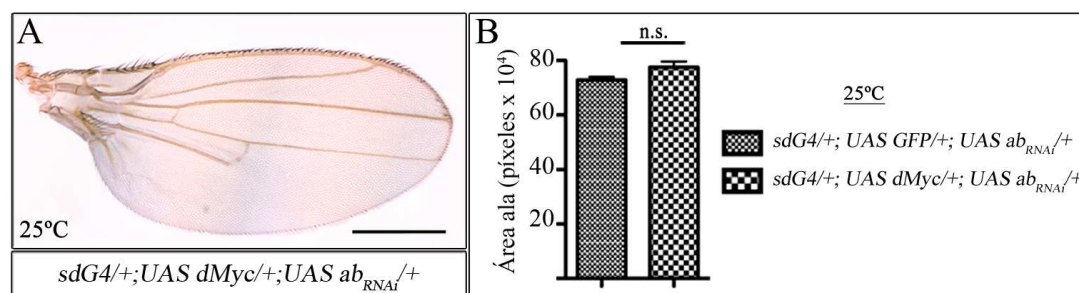


Figura 42: La sobre-expresión de dMyc no afecta la reducción del tamaño de las alas producido por la inactivación de *abrupt*.

A) Ala *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab_{RNAi}/+* desarrollada a 25°C. **B)** Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab_{RNAi}/+* versus *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* desarrolladas a 25°C (n=20 alas para cada genotipo). La barra de calibración representa 500 µm. n.s.: no significativo.

En conjunto, estos resultados indican que el fenotipo de reducción del tamaño de las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* se rescata con la sobre-expresión de CycD-Cdk4, de CycE y la inactivación de *dacapo*, lo cual sugiere que *abrupt* regula el tamaño del ala a través de la regulación directa o indirecta de *CycD-Cdk4* y de *CycE-Cdk2*. En el caso de su otra posible diana, dMyc, los resultados sugieren un posible bucle de interacción entre dMyc y Ab que debería ser analizado con más detalle.

3. Función de las proteínas de los grupos Polycomb (PcG) y trithorax (trxG) en el control de la apoptosis.

Una de las líneas de investigación que se llevan a cabo en el laboratorio es el estudio del efecto de los microRNAs sobre la modulación de la expresión de los genes del grupo Polycomb y trithorax, factores epigenéticos filogenéticamente conservados y esenciales en el desarrollo y vida de los organismos (capítulo 4.3 de la Introducción). El análisis de las regiones 3'UTRs de los genes PcG y trxG llevada a cabo en el laboratorio indica que la expresión de los genes PcG/trxG está regulada por microRNAs. Además, el análisis de la función de varios de estos microRNAs, reguladores putativos de la expresión de los genes PcG/trxG, indicaba que regulaban el proceso de apoptosis (Aparicio *et al.* sin publicar) por lo que se decidió comenzar a estudiar la función de las proteínas PcG/trxG en la apoptosis con el fin de descifrar los mecanismos implicados en el eje regulador microRNAs-PcG/trxG. Se decidió analizar la función de las proteínas E3-ubiquitin ligasas dBre1 (trxG) y Sce/dRING1 (PcG) en el proceso de apoptosis, y en particular en la apoptosis dependiente del supresor de tumores Dp53 usando, de nuevo, el disco imaginal de ala como sistema modelo.

3.1 Análisis de la función de la proteína dBre1 en la apoptosis

3.1.a Bajos niveles de dBre1 promueven apoptosis dependiente de los niveles de Dp53

Se analizó el papel de *dBre1* en la apoptosis a través del análisis del efecto de la inactivación de la función de *dBre1* en los niveles de expresión de C3. Se empleó la técnica Gal4/UAS y tres líneas diferentes *UAS dBre1^{RNAi}*: #GL00368, #JF01309 y #JF02853 (BDSC, Materiales y Métodos). Se observó que los discos imaginales *sdG4/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* presentan activación de los niveles de C3 cuando se desarrollaban a 29°C (Figura 43A-C). De las tres líneas *UAS dBre1^{RNAi}* utilizadas, la línea #GL00368 (Figura 43A) inducía apoptosis más débilmente que la #JF01309 (Figura 43B) y, a su vez, ésta la inducía más débilmente que la línea #JF02853 (Figura 43C), que, de las tres líneas analizadas, producía apoptosis a niveles más fuertes. Por ello, se decidió continuar el estudio analizando el fenotipo de inactivación de *dBre1*, usando la línea #JF02853 (de ahora en adelante será mencionada como *UAS dBre1^{RNAi}*) dado que presenta una mayor expresividad de fenotipo apoptótico. Se sobre-expresó DIAP1 (Hay et al., 1995) para comprobar si se podía rescatar la activación ectópica de la apoptosis usando como reportero la expresión de C3. Las discos imaginales de ala de larvas *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 43D) presentan una fuerte reducción de los niveles de C3, del 47%, cuando se compararon con los discos de larvas control *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 43G), indicando que la sobre-expresión de DIAP1 reduce los niveles de apoptosis que se producen debido a la inactivación de *dBre1*. Curiosamente, en el caso de las alas *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 43E-F) se observó que presentaban una reducción de tamaño del 15% respecto a las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 43H) sugiriendo que la reducción del tamaño de las alas observada en ausencia de *dBre1* no es solo debido a la apoptosis. Estos resultados sugieren que *dBre1* es un inhibidor de la apoptosis.

Para analizar los mecanismos por los que *dBre1* inhibe la apoptosis, se analizó si la apoptosis debida a la inactivación de *dBre1* depende de Dp53. Para ello, se empleó un ARN de interferencia (RNAi) de *Dp53*. Se compararon los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS dBre1^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}* (Figura 43I) con los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dBre1^{RNAi}/+*. Se observó un incremento significativo de los niveles de C3 cuando se inactivaba simultáneamente la función de *dBre1* y la de *Dp53* (Figura 43K). Además, los fenotipos de las alas de las moscas *sdG4/+; UAS dBre1^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}* (Figura 43J) apoyan el incremento de apoptosis observado en los discos ya que presentan una reducción del tamaño del 36% respecto al tamaño de las alas de moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 43L). Estos resultados indican que la apoptosis que se observa en la inactivación de *dBre1* es dependiente de los niveles de *Dp53*. Este resultado sugiere que *dBre1* podría controlar (y quizás requerir) la expresión de Dp53 a nivel transcripcional o quizás a nivel post-transcripcional.

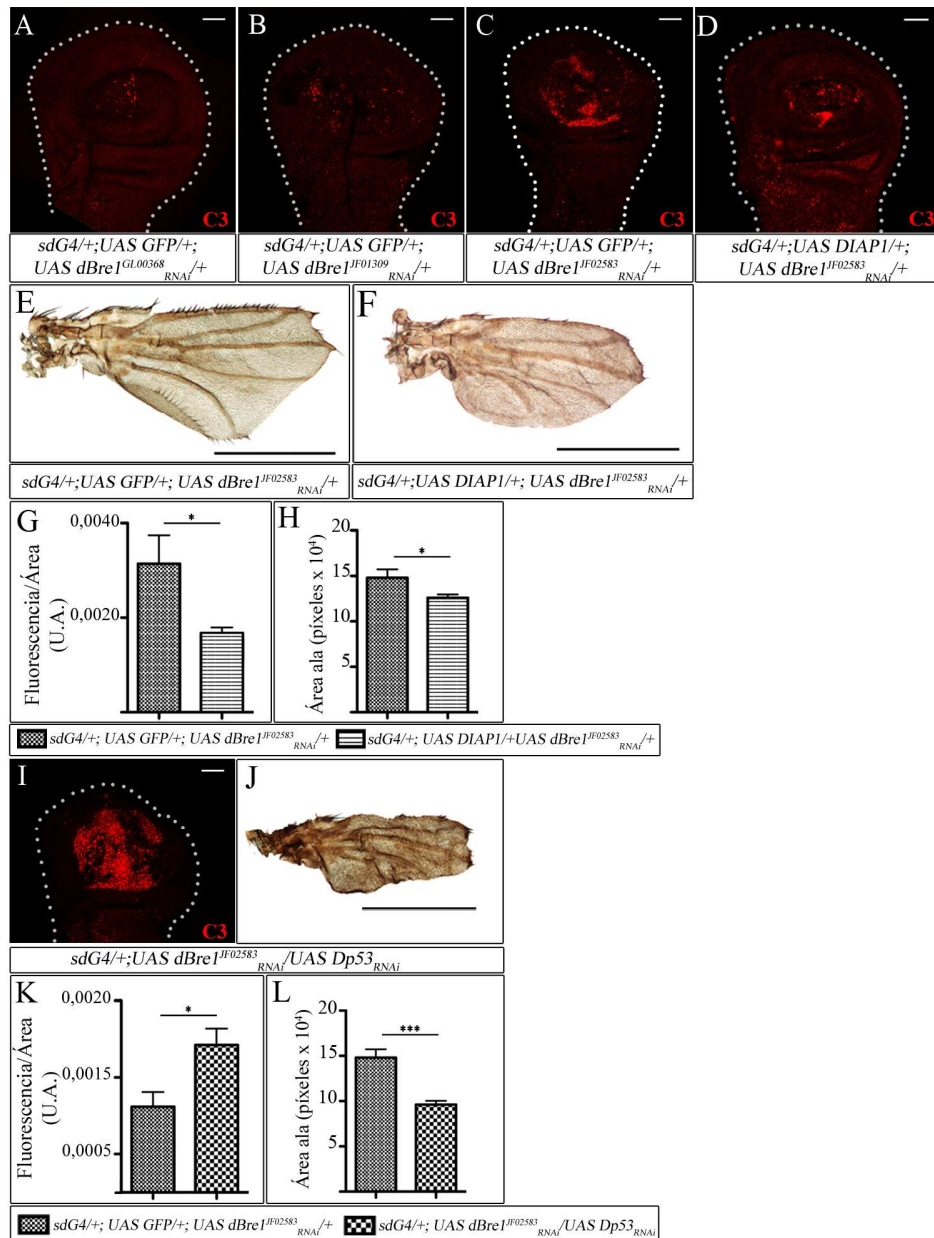


Figura 43: La inactivación de la función de *dBre1* promueve apoptosis dependiente de *Dp53*.

A) Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{GL00368} RNAi /+*. **B)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF01309} RNAi /+*. **C)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+*. **D)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+*. Nótese la disminución de C3 respecto a (C). **E)** Ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+*. **F)** Ala *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+*. Compárese el tamaño con (E). **G)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área en discos *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* versus *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=8 discos para cada genotipo). **H)** Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* versus *sdG4/+; UAS DIAP1/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* (n=20 discos para cada genotipo). **I)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi / UAS Dp53^{RNAi}*. Compárese el aumento de C3 respecto a (C). **J)** Ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi / UAS Dp53^{RNAi}*. **K)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área en discos *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* versus *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi / UAS Dp53^{RNAi}* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=8 discos para cada genotipo). **L)** Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi /+* versus *sdG4; UAS GFP/+; UAS Bre1^{JF02583} RNAi / UAS Dp53^{RNAi}* (n=20 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m para los discos y 500 μ m para las alas. * 0,01 < p < 0,05, *** p < 0,001.

Se comprobó si en los discos de falta de función de *dBre1* aumentan los niveles de Dp53 haciendo uso de la construcción p53-RE-GFP que contiene un elemento de respuesta a P53 (Wylie et al., 2014). Por tanto, se empleó el reportero, P53-RE-GFP, que como se ha descrito en la Figura 26F, contiene un elemento *cis*-regulador de respuesta a Dp53 aislado del promotor del gen pro-apoptótico *reaper* que responde a altos niveles de GFP (Wylie et al., 2014). Para conocer si la respuesta de *P53-RE-GFP* a altos niveles de expresión de Dp53 en el disco, dependía de la isoforma de Dp53, se empleó la sobre-expresión de Dp53, tanto con la isoforma completa (denominada “full lenght”, Dp53) como con la isoforma truncada (denominada Δ Np53) (Dichtel-Danjoy et al., 2013). Se observó que la sobre-expresión en los discos imaginales de cada una de estas isoformas (*sdG4/+; p53-RE-GFP/UAS Dp53* (Figura 44A-A’’) y *sdG4/+; p53-RE-GFP/UAS Δ Np53* (Apéndice 4, Figura A4. 1) induce la expresión de GFP, demostrándose así que *P53-RE-GFP* responde a los altos niveles de Dp53. Dado que ambas isoformas activan la expresión de *P53-RE-GFP*, se decidió continuar el trabajo empleando la isoforma “full lenght”, de Dp53.

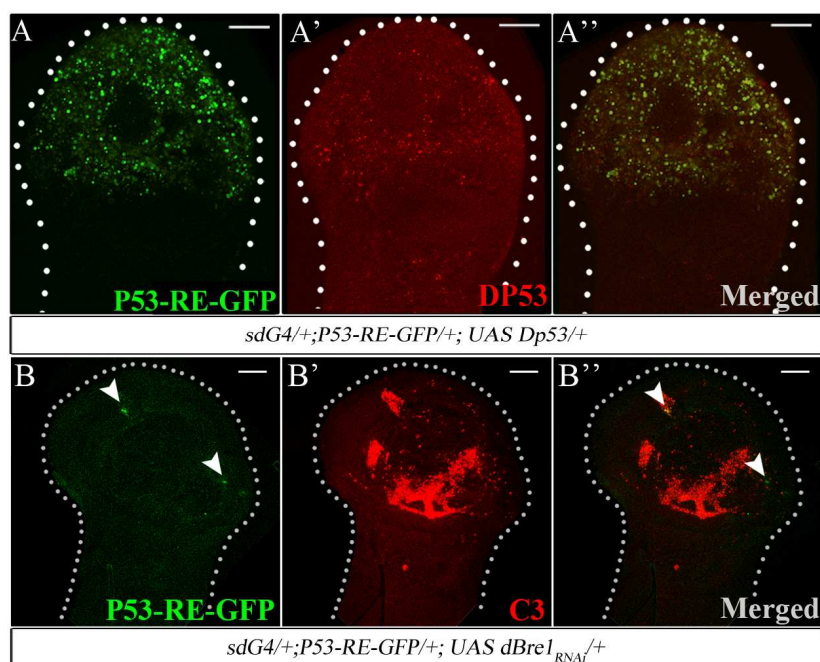


Figura 44: Efecto de la falta de función de *dBre1* en la activación de P53-RE-GFP.

(A-A’) Disco de ala *sdG4/+; p53-RE-GFP/UAS Dp53*. **A)** Expresión GFP del reportero P53-RE-GFP (verde) en la región del “wing pouch” donde se sobre-expresa Dp53. **A’)** Expresión de Dp53 (rojo) únicamente en la región del “wing pouch” donde se sobre-expresa. **A’’) Superposición de las imágenes (A) y (A’).** **(B-B’)** Disco de ala *sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS *dBre1*^{RNAi}/+*. **B)** Expresión GFP del reportero P53-RE-GFP (verde) en las regiones donde apuntan las cabezas de flecha. **B’)** Expresión de C3 (rojo) en la región del “wing pouch” donde *scalloped* dirige la inactivación de *dBre1*. **B’’) Superposición de las imágenes (B) y (B’).** Las barras de calibración representan 50 μ m.

Como se puede observar en la figura 44, en los discos *sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS *dBre1*^{RNAi}/+* se detecta la activación de la expresión de GFP (Figura 44B-B’), sugiriendo que la falta de función de *dBre1* incrementa los niveles de expresión de Dp53. Este aumento de la expresión de GFP podía ser debido bien a que *dBre1* silencia transcripcionalmente a Dp53 o bien a que la ausencia de *dBre1* produce un incremento de los niveles de Dp53 debido a que

dBre1, por su actividad como E3-ubiquitin ligasa, participa en el proceso de degradación de Dp53.

Para empezar a discernir entre estas dos posibilidades, se estudió también el efecto de los altos niveles de dBre1 en el desarrollo del disco de ala. Se observó que los discos de ala *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/+* presentan activación de la apoptosis (Figura 45A). Por tanto, se decidió analizar si la apoptosis inducida por los altos niveles de dBre1 es dependiente de Dp53 como ocurre en la falta de función de *dBre1*. Curiosamente, los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/UAS Dp53^{RNAi}* (Figura 45B) no varían respecto a los discos *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/+* (Figura 45C) indicando en este caso que la apoptosis debida a la sobre-expresión de dBre1 no es dependiente de los niveles de Dp53. Y, sugiriendo que la sobre-expresión actúa a través de mecanismos diferentes a los que se producen cuando hay bajos niveles de *dBre1*.

Por tanto, el resultados de los estudios sobre el papel de *dBre1* en la apoptosis, indica que dBre1 es un inhibidor de este proceso y que lo hace conjuntamente con Dp53.

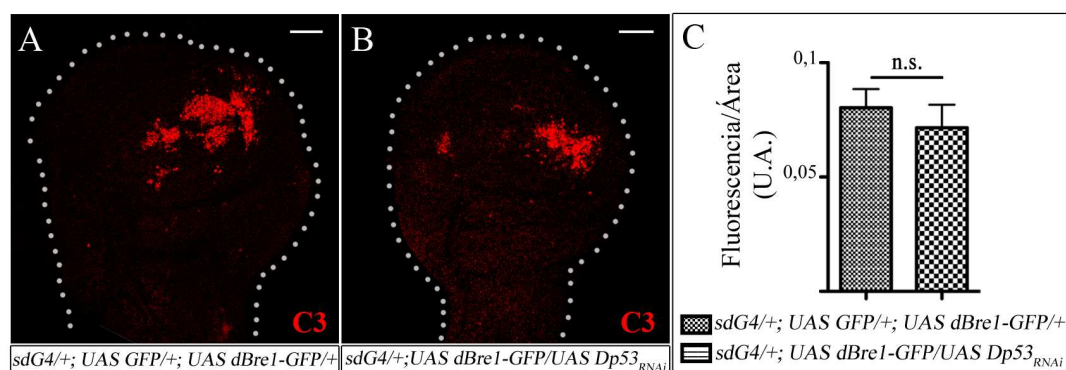


Figura 45: La apoptosis debida a altos niveles de dBre1 es independiente de Dp53.

A) Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/+*. **B)** Expresión de C3 (rojo) en disco *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/UAS Dp53^{RNAi}*, compárese con (A). **C)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área en discos *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/+* versus *sdG4/+; UAS dBre1-GFP/UAS Dp53^{RNAi}* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=9 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m. n.s.: no significativo.

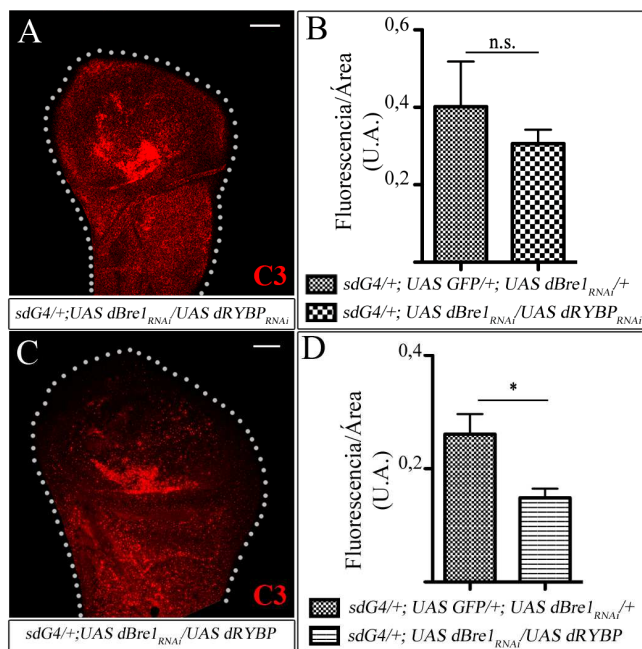
3.1.b Altos niveles de dRYBP disminuye la apoptosis inducida por la falta de función de dBre1

La proteína dRYBP interacciona tanto genética como físicamente con la proteína dBre1 (Ferreles et al., 2014) y está involucrada en el control de la apoptosis, ya que los bajos niveles de dRYBP producen una débil inducción de la apoptosis (Ferreles et al., 2013) y los altos niveles de dRYBP producen una fuerte inducción de la apoptosis (Gonzalez et al., 2008).

Así pues, se decidió analizar el papel de dRYBP en la apoptosis dependiente de *dBre1*. Se analizaron los niveles de C3 en los discos *sdG4/+; UAS dBre1^{RNAi}/UAS dRYBP^{RNAi}* (Figura 46A) y no se observaron cambios significativos en comparación con los niveles de C3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dBre1^{RNAi}/+* (Figura 46B). Esto puede ser debido a que o bien dRYBP y dBre1 no interaccionan en el control de la apoptosis, o bien a que la fuerte apoptosis que produce la inactivación de *dBre1* enmascare el débil efecto de la inactivación de *dRYBP* (Ferreles et al., 2013).

Por otro lado, se estudió el efecto de la sobre-expresión de dRYBP en la apoptosis inducida por la inactivación de *dBre1*. Los discos *sdG4/+; UAS dBre1^{RNAi}/UAS dRYBP* (Figura 46C) presentan una menor activación de la apoptosis que los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS*

dBre1^{RNAi/+} (Figura 46D). Por tanto, estos resultados indican que los altos niveles de dRYBP disminuyen los niveles de la apoptosis dependiente de *dBre1*.



En conjunto, todos los resultados del análisis de la función de *dBre1* en la apoptosis indican que *dBre1* se requiere para el control de la apoptosis y su papel implica necesariamente la presencia de Dp53. Por otro lado, dRYBP, proteína que se sabe está implicada directamente en el control de apoptosis, es capaz de disminuir los niveles de apoptosis para promover supervivencia de las células con bajos niveles de *dBre1*.

3.2 Análisis de la función de la proteína Sce en el control de la apoptosis

3.2.a Bajos niveles de Sce promueven apoptosis dependiente de Dp53

Para estudiar los fenotipos asociados a la falta de función de *Sce* se hizo uso del sistema UAS/GAL4 y la línea *UAS Sce^{RNAi}*. Para comprobar la eficacia de la inactivación, se estudió la expresión de *Sce* en discos *enG4/UAS GFP; UAS Sce^{RNAi/+}*. Como se observa en la Figura 47A-A'', la expresión de *Sce* en el compartimento posterior del disco donde *Sce* está inactivado, está significativamente disminuida al compararse con la expresión en el compartimento anterior. Además, se observó que las alas *enG4/UAS GFP; UAS Sce^{RNAi/+}* presentaban una reducción en el compartimento posterior del ala (datos no mostrados).

Para analizar en detalle el efecto de la inactivación de *Sce* en la apoptosis, se decidió utilizar la línea *sdG4* y evaluar los niveles de C3. Además, también se analizó la expresión del gen homeótico *Ubx*, ya que se esperaba que en estas condiciones *Ubx* se expresase en el disco de ala debido al papel de *Sce* en el silenciamiento de la expresión de los genes homeóticos (Gutierrez et al., 2012).

Como se puede observar en la Figura 47, los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* presentan expresión de Ubx (Figura 47B) y, curiosamente, presentan altos niveles de C3 (Figura 47B'), indicando una fuerte activación de apoptosis. Además, las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* presentan una gran reducción en su tamaño (comparado con alas control *sdG4/+; UAS GFP/+*) y características morfológicas de halterio debido a la expresión ectópica de Ubx en el ala (Figura 47C). Estos resultados indican que *Sce* es necesario para la inhibición de la apoptosis.

Se quiso determinar si la apoptosis observada en los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* era debida a la expresión ectópica de Ubx en el disco. Para ello, se inactivó simultáneamente *Sce* y *Ubx* y se estudió la expresión de C3 y de Ubx. Los discos *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Ubx^{RNAi}* no presentan expresión ectópica de Ubx (Figura 47D), pero muestran expresión de C3 (Figura 47D') y, por tanto, activación de la apoptosis. Además, debido a que se inhibe la expresión de Ubx en el ala, se observa que el fenotipo de las alas *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Ubx^{RNAi}* (Figura 47E) se rescata parcialmente tanto en el tamaño como en la morfología respecto al fenotipo observado en las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*. A pesar de este rescate, el tamaño de las alas *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Ubx^{RNAi}* está bastante reducido si se compara con alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*, indicando que la apoptosis contribuye al fenotipo de reducción de las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*. Por tanto, se concluye que la falta de función de *Sce* induce apoptosis en el disco de ala independientemente de los niveles de *Ubx*.

Para estudiar los mecanismos por los cuales *Sce* inhibe la apoptosis, se decidió analizar el papel de *Dp53*. Para ello, se estudió si la apoptosis que se observa en los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* es dependiente de *Dp53*. Para ello se empleó la línea *UAS Dp53^{RNAi}* y se estudiaron los niveles de C3 en los discos *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}*. Como se puede observar en la Figura 47, en estos discos de ala no se detecta tinción de C3 (Figura 47F') aunque presentan expresión de Ubx (Figura 47F). Además, las alas *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}* presentan transformación hacia halterio debido a la expresión ectópica de Ubx, pero aún así, el tamaño de esas alas es mayor que el que presentan las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* (Figura 47G). Estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por la falta de función de *Sce* depende de *Dp53*.

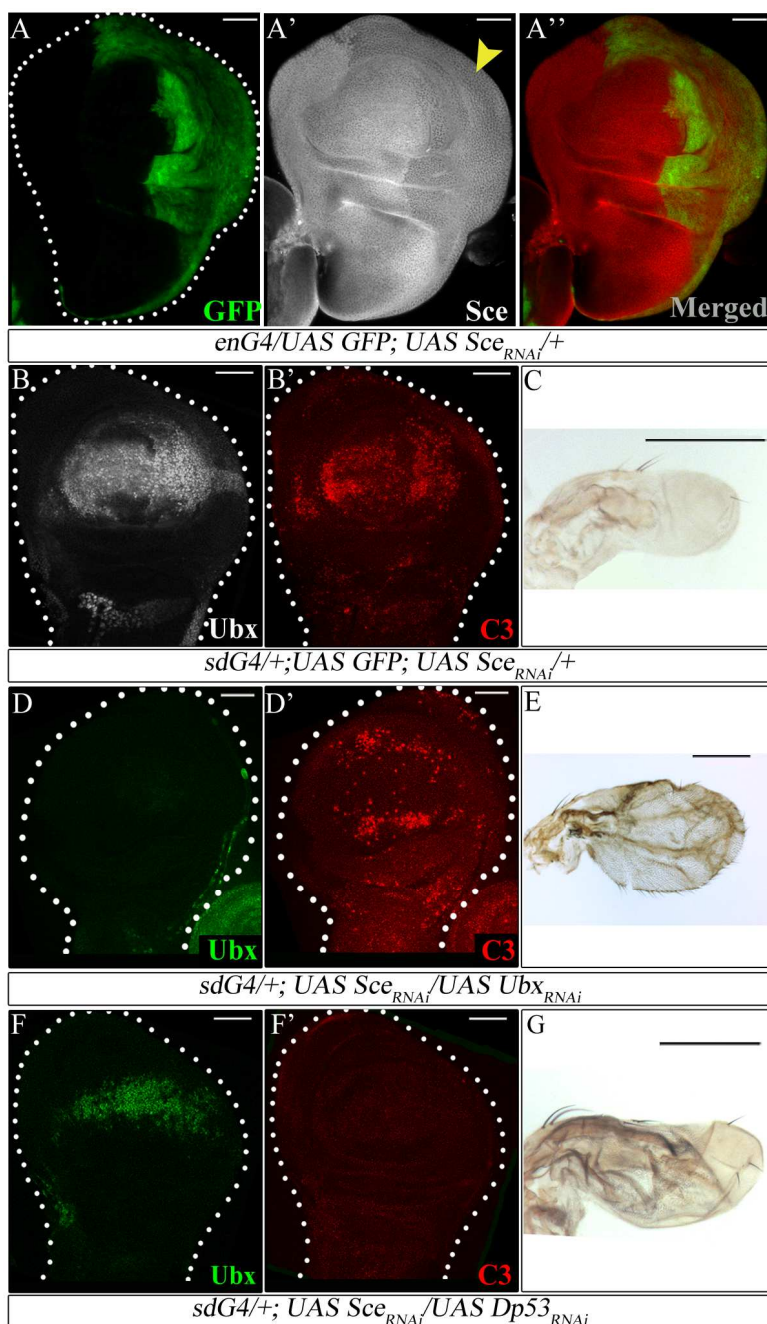


Figura 47: Bajos niveles de Sce promueven apoptosis dependiente de Dp53.

(A-A'') Disco de ala *enG4/UAS GFP; UAS Sce^{RNAi}/+*. **A)** Expresión de GFP (verde) en el compartimento posterior. **A')** Expresión de Sce (blanco). Nótese la disminución de los niveles en el compartimento posterior (cabeza de flecha) respecto al compartimento anterior. **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). **(B-B')** Disco *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*. **B)** Expresión de Ubx (blanco). **B')** Expresión de C3 (rojo). **C)** Ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*. Compárese con el ala control (*sdG4/+; UAS GFP/+*) mostrado en la Figura 29H, página 63. **(D-D')** Disco de ala *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Ubx^{RNAi}*. **D)** Expresión de Ubx (verde). Nótese la ausencia de expresión de Ubx comparado con (B). **D')** Expresión de C3 (rojo). Obsérvese que aún en ausencia de Ubx se observa expresión de C3 como en (B'). **E)** Ala *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Ubx^{RNAi}*. Obsérvese el aumento de tamaño respecto a (C). **(F-F')** Disco de ala *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}*. **F)** Expresión de Ubx (verde). **F')** Expresión de C3 (rojo). Obsérvese la ausencia de expresión respecto a (B') y a (D'). **G)** Ala *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}*. A pesar de que presenta

un mayor tamaño que (C), la fuerte des-represión de Ubx impide ver un rescate como en (E). Las barras de calibración representan 50 μ m y 250 μ m para las alas.

Aunque la inactivación de *Sce* induce expresión ectópica de Ubx independiente de la activación de apoptosis, se decidió comprobar si la variación de los niveles de Ubx por sí solos en el disco de ala inducen apoptosis. Para ello se analizó tanto la expresión de C3 y la de Dp53 mediante el uso del reportero P53-RE-GFP. Como se observa en la figura 48, tanto los discos de ala donde se inactiva la expresión de Ubx mediante un RNAi (*sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS Ubx^{RNAi}/+*, Figura 48A-A'') como los discos de ala donde se sobre-expresa Ubx (*sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS Ubx/+*, Figura 48B-B'') no presentan expresión de C3 ni de GFP, indicando por un lado, que la inactivación de Ubx en el disco de ala, donde en condiciones salvajes solamente se expresa en la membrana peripodial, no produce ninguna alteración. Mientras por otro lado, la

expresión ectópica de Ubx en el disco de ala produce una reducción muy fuerte del “wing pouch” del disco de ala, pero no debido a la activación de la apoptosis o a la presencia de altos niveles de Dp53, sino simplemente debido al efecto de Ubx al inducir la transformación del ala en halterio.

Se estudiaron los niveles de expresión de la proteína Dp53 en los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce_{RNAi}/+*. Para ello se utilizaron los anticuerpos anti-Dp53 disponibles y en estas condiciones, no se pudo detectar la expresión de Dp53. Cabe destacar que hasta ahora, no ha sido posible detectar los niveles endógenos de Dp53 mediante los anticuerpos disponibles (Shlevkov & Morata, 2012; Simon et al., 2014). Esto puede ser debido o bien a una falta de sensibilidad de los anticuerpos (que sí detectan la sobre-expresión de Dp53) o bien a que la proteína Dp53 en condiciones normales está siendo constantemente degradada y solo se elevan sus niveles en condiciones de estrés, por lo que los niveles endógenos de Dp53 serían muy bajos y difícilmente detectables mediante el uso de los anticuerpos disponibles. Por tanto, se empleó el reportero de Dp53, P53-RE-GFP.

Se estudió la respuesta de *P53-RE-GFP* mediante el análisis de la expresión GFP en discos de ala donde se inactiva la función de *Sce* (*sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS Sce_{RNAi}/+*). Se observó una activación de la expresión de GFP, indicando por tanto que la falta de función de *Sce* aumenta los niveles de Dp53 (Figura 48C). Esta activación es débil pero significativa, apoyando los resultados de que la apoptosis debida a la inactivación de *Sce* es dependiente de Dp53. Esta débil respuesta de *P53-RE-GFP* puede de nuevo ser debida bien a procesos de degradación de Dp53 o bien a una función redundante de otras E3-ubiquitin ligasas disponibles para la degradación de Dp53. Para comprobar la respuesta del reportero P53-RE-GFP a la inactivación de otra E3-ubiquitin ligasa cuya implicación en la estabilización de los niveles de Dp53 hubiese sido demostrada, se decidió estudiar la respuesta del reportero P53-RE-GFP a la inactivación de *bonus* (Allton et al., 2009; Jain & Barton, 2010). El resultado es similar a la inactivación de *Sce*, el reportero P53-RE-GFP presenta una respuesta débil, pero significativa (Apéndice 4, Figura A4. 2).

En conjunto, estos resultados indican que *Sce* es necesario para inhibir la apoptosis y que esta función inhibidora de la apoptosis es independiente de la expresión de Ubx y dependiente de Dp53. Además, estos resultados muestran que *Sce* es necesario para controlar los niveles de Dp53.

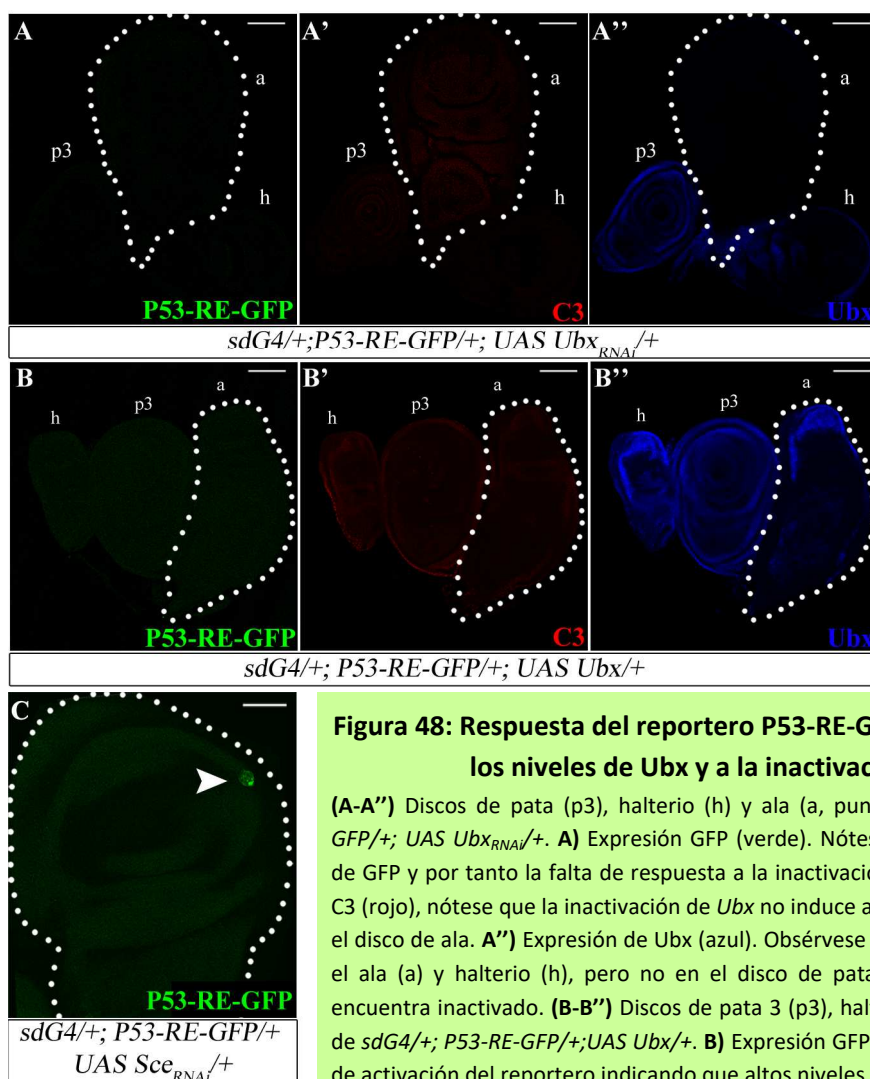


Figura 48: Respuesta del reportero P53-RE-GFP a la modulación de los niveles de Ubx y a la inactivación de Sce.

(A-A'') Discos de pata (p3), halterio (h) y ala (a, punteado) de *sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS Ubx^{RNAi}/+*. **A**) Expresión GFP (verde). Nótese la ausencia de expresión de GFP y por tanto la falta de respuesta a la inactivación de *Ubx*. **A')** Expresión de C3 (rojo), nótese que la inactivación de *Ubx* no induce activación de la apoptosis en el disco de ala. **A'')** Expresión de Ubx (azul). Obsérvese la ausencia de expresión en el ala (a) y halterio (h), pero no en el disco de pata 3 (p3), donde *Ubx* no se encuentra inactivado. (**B-B''**) Discos de pata 3 (p3), halterio (h) y ala (a, punteado) de *sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS Ubx/+*. **B**) Expresión GFP (verde). Nótese la ausencia de activación del reportero indicando que altos niveles de Ubx no inducen su

activación. **B')** Expresión de C3 (rojo), nótese que la sobre-expresión de Ubx en el disco de ala no induce activación de la apoptosis. **B'')** Expresión de Ubx (azul), obsérvese la expresión ectópica de Ubx en el ala. **C**) Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+*, mostrando la expresión GFP (verde, cabeza de flecha). Las barras de calibración representan 50 μ m.

3.2.b Altos niveles de Sce inhiben la apoptosis inducida por altos niveles de Dp53

Sabiendo que los bajos niveles de *Sce* promueven la activación de la apoptosis, se decidió investigar el efecto de sobre-expresión de *Sce*. Para ello se empleó la línea *UAS Sce-FLAG* la cual se demostró que rescataba el fenotipo producido por el alelo mutante *Sce*¹ (Langlais et al., 2012). Se comprobó la eficacia de la línea *UAS Sce-FLAG* en la inducción de altos niveles de expresión de la proteína *Sce*. Como se observa en la Figura 49A', los discos *sdG4/+; UAS Sce-FLAG/+* presentan altos niveles de expresión de *Sce* en la región del "wing pouch" donde *sdG4* dirige su expresión. Además, los discos *sdG4/+; UAS Sce-FLAG/+* no presentan expresión de C3 (Figura 49A') y las alas resultantes son similares a las alas salvajes (Figura 49B). Por tanto, estos resultados validan el uso la línea *UAS Sce-FLAG* para analizar su efecto en la apoptosis durante este estudio.

Ya que *Sce* se requiere para el control de la apoptosis a través del control de los niveles de Dp53 y, además, la sobre-expresión de *Sce* no tiene efectos morfológicos en las alas de las moscas, se decidió analizar si los altos niveles de *Sce* son suficientes para inhibir la apoptosis desencadenada en este caso por los altos niveles de Dp53. Se comparó la activación de la

expresión de GFP usando la construcción *P53-RE-GFP* como reportero de los niveles de la proteína Dp53 y la expresión de C3 como reportero de la apoptosis en los discos *sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS LacZ/+* con los discos *sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS Sce-FLAG/+* (Figura 49C-C''). Como se observa en la Figura 49, los altos niveles de Dp53 (*sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS LacZ/+*) inducen una fuerte activación de la expresión de C3 y de GFP en los discos. Tanto los niveles de Dp53, C3 y GFP resultan significativamente reducidos en presencia de altos niveles de Sce (Figura 49G) (*sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS Sce-FLAG/+*, Figura 49E-E''). Además, el efecto de los altos niveles de Sce también es morfológicamente detectable en el tamaño de los discos así como en el de las alas resultantes (Figura 49D,F). Se obtuvieron los mismos resultados cuando se empleó la isoforma truncada de Dp53 (Apéndice 4, Figura A4. 3).

Por tanto, estos resultados indican que los altos niveles de Sce inhiben la apoptosis dependiente de Dp53 y queda resaltado el papel de Sce como regulador de la apoptosis a través de la modulación de los niveles de Dp53.

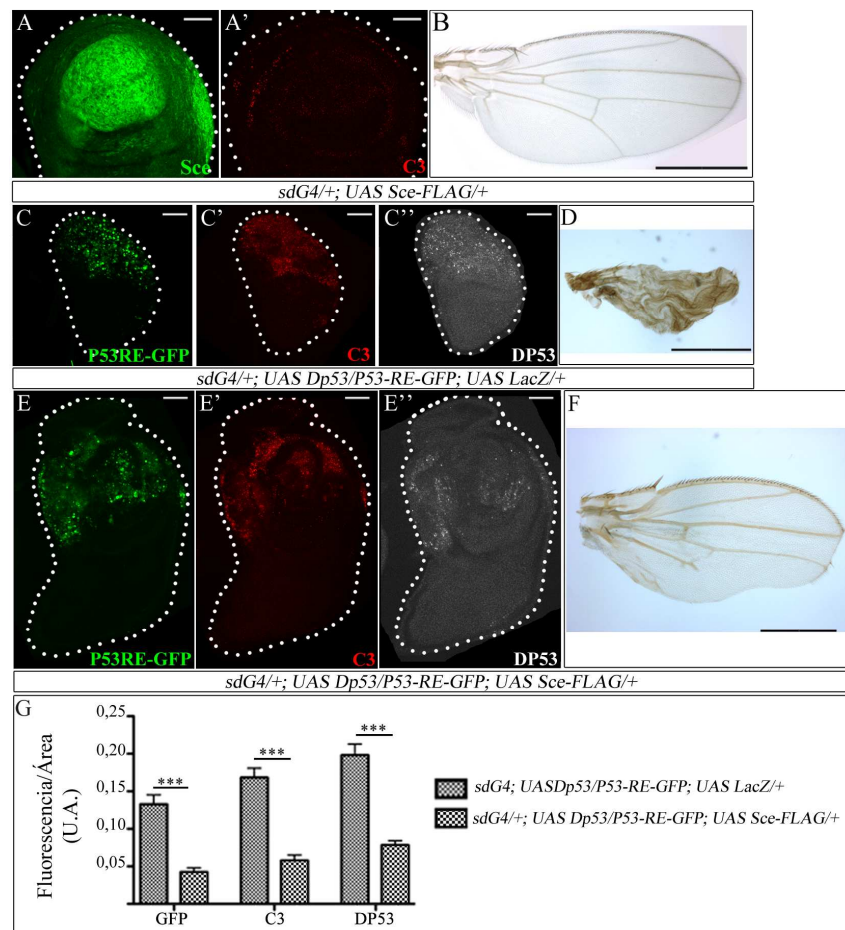


Figura 49: La sobre-expresión de Sce inhibe la apoptosis inducida por los altos niveles de Dp53.

(A-A') Disco de ala *sdG4/+*; *UAS Sce-FLAG/+*. A) Expresión de Sce (verde) en la región del "wing pouch" donde tiene lugar la sobre-expresión de Sce. A') Expresión de C3 (rojo). B) Ala *sdG4/+*; *UAS Sce-FLAG/+*. Nótese que tanto la morfología como el tamaño resultan muy similares, sino idénticos, al de un ala salvaje. C) Ala *sdG4/+*; *UAS GFP/+*; *UAS Sce^{RNAi}/+*. (C-C'') Disco de ala *sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS LacZ/+*. C) Expresión de GFP (verde). C') Expresión de C3 (rojo). C'') Expresión de DP53 (blanco) en la región del "wing pouch" donde se está sobre-expresando Dp53. D) Ala *sdG4/+*; *P53-RE-GFP/UAS Dp53*; *UAS LacZ/+*. (E-E'')

Disco de ala *sdG4/+; P53-RE-GFP/UAS Dp53; UAS Sce-FLAG/+*. **E)** Expresión de GFP (verde). **E')** Expresión de C3 (rojo). **E'')** Expresión de DP53 (blanco). **F)** Ala *sdG4/+; P53-RE-GFP/UAS Dp53; UAS Sce-FLAG/+*. Nótese la mejoría de tamaño respecto a (D). **G)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de GFP, C3 y DP53 de los discos *sdG4/+; P53-RE-GFP/UAS Dp53; UAS LacZ/+* versus *sdG4/+; P53-RE-GFP/UAS Dp53; UAS Sce-FLAG/+* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m para los discos y 500 μ m para las alas. *** $p < 0,001$.

3.2.c *Sce y dRYBP cooperan en la inhibición de la apoptosis mediante la modulación de los niveles de Dp53*

Resultados previos del laboratorio indicaban que *Sce* interacciona tanto genética como físicamente con *dRYBP* (Ferreres et al., 2014). Además, *dRYBP* tiene un papel en el control de la muerte celular (Ferreres et al., 2013). Se estudió, por tanto, el efecto de la inactivación y de la sobre-expresión de *dRYBP* en la inhibición de la apoptosis mediada por altos y bajos niveles de *Sce*.

Primero, se analizó el efecto de la inactivación conjunta de *dRYBP* y de *Sce*. Los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS Sce^{RNAi}/UAS dRYBP^{RNAi}* es muy similar a los niveles de C3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce^{RNAi}/+* (datos no mostrados). Esta falta aparente de interacción podría deberse o bien a que *Sce* y *dRYBP* no colaboran en la represión de la apoptosis o bien a que como la inactivación de *dRYBP* produce una activación de apoptosis muy débil (Ferreres et al., 2013) y el efecto de la inactivación de *Sce* es tan fuerte, es posible que sea difícil apreciar una posible interacción entre los dos.

Segundo, se analizó si la inactivación de *dRYBP* influye en la inhibición de la apoptosis mediada por altos niveles de *Sce*. Resultados previos indican que la débil apoptosis que se induce en los discos con bajos niveles de *dRYBP* depende de los niveles de *Dp53*, ya que se observa un rescate del fenotipo de las alas *sdG4/+; UAS dRYBP^{RNAi}/UAS Dp53^{RNAi}* cuando se inactiva *Dp53* (Tesis Doctoral Rocío Simón). Dado que durante el desarrollo del disco de ala salvaje no tiene lugar apoptosis significativa (datos no mostrados, Gonzalez & Busturia, 2009), se decidió emplear la sobre-expresión de *Dp53* como desencadenante de apoptosis. Se compararon los niveles de C3 y de *Dp53* de discos control *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS LacZ* (Figura 50A-A''), con discos *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS dRYBP^{RNAi}* (Figura 50B-B''). Los resultados indican que cuando se inactiva la expresión de *dRYBP* junto con la sobre-expresión de *Sce* se produce una reducción en el tamaño de los discos que se refleja tanto en el incremento de los niveles de C3 como en el incremento de los niveles de *Dp53* (Figura 50C). Este resultado demuestra que *Sce* coopera con *dRYBP* para inhibir la apoptosis y controlar los niveles de *Dp53*.

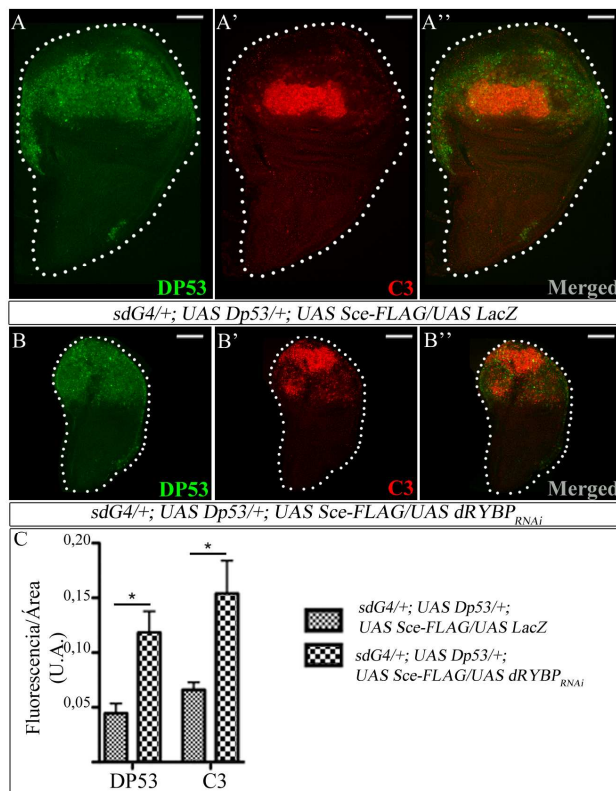


Figura 50: Efecto de la inactivación de *dRYBP* y de la sobre-expresión de *Sce* en la apoptosis inducida por altos niveles de *Dp53*.

(A-A'') Disco de ala *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS LacZ*. A) Expresión de DP53 debido a la sobre-expresión de Dp53 (verde) en la región del "wing pouch". A') Expresión de C3 (rojo). A'') Superposición de las imágenes (A) y (A'). (B-B'') Disco *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS dRYBP_{RNAi}*. Obsérvese la disminución de tamaño respecto a (A-A''). B) Expresión de DP53 (verde) en la región del "wing pouch". B') Expresión de C3 (rojo). B'') Superposición de las imágenes (B) y (B'). C) Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de GFP, C3 y DP53 de los discos *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS LacZ* versus *sdG4/+; UAS Dp53/+; UAS Sce-FLAG/UAS dRYBP_{RNAi}*. (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m para los discos. * $p < 0,01-0,05$.

También, se estudió el efecto de los altos niveles de dRYBP en la inhibición de apoptosis mediada por los altos niveles de Sce. Se había descrito previamente que la sobre-expresión de dRYBP promueve la activación de la apoptosis (Figura 51A, Gonzalez et al., 2008) que va acompañada de la des-represión de Ubx en el ala (Figura 51A', Gonzalez et al., 2008). Sin embargo, no se conocía si la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP era dependiente de Dp53 y/o de los niveles de Ubx. Para ello, primero, se analizó la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP en ausencia de *Ubx* y por otro lado en ausencia de *Dp53*.

Al inactivar la expresión de *Ubx* (Figura 51C'), los discos de ala *sdG4/+; UAS dRYBP/UAS Ubx_{RNAi}* presentan activación de la expresión de C3 (Figura 51C) y las alas *sdG4/+; UAS dRYBP/UAS Ubx_{RNAi}* (Figura 51D) presentan un ligero rescate del fenotipo respecto a las alas *sdG4/+ UAS GFP/+; UAS dRYBP/+* (Figura 51B). Estos resultados indican que la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP es independiente de la expresión ectópica de Ubx observada en el ala en estas condiciones. Curiosamente, cuando se inactiva *Dp53* en presencia de altos niveles de dRYBP, los discos *sdG4/+; UAS dRYBP/UAS Dp53_{RNAi}* no presentan activación de C3 en el disco de ala (Figura 51E) a pesar de presentar des-represión de Ubx (Figura 51E'). Además, las alas presentan un rescate de tamaño y morfología respecto a las alas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dRYBP/+* y respecto a las alas *sdG4/+; UAS dRYBP/UAS Ubx_{RNAi}* (Figura 51F). Estos resultados indican que la apoptosis debida a los altos niveles de dRYBP es dependiente de Dp53 y es independiente de la expresión de Ubx inherente, a la sobre-expresión de dRYBP en el disco de ala.

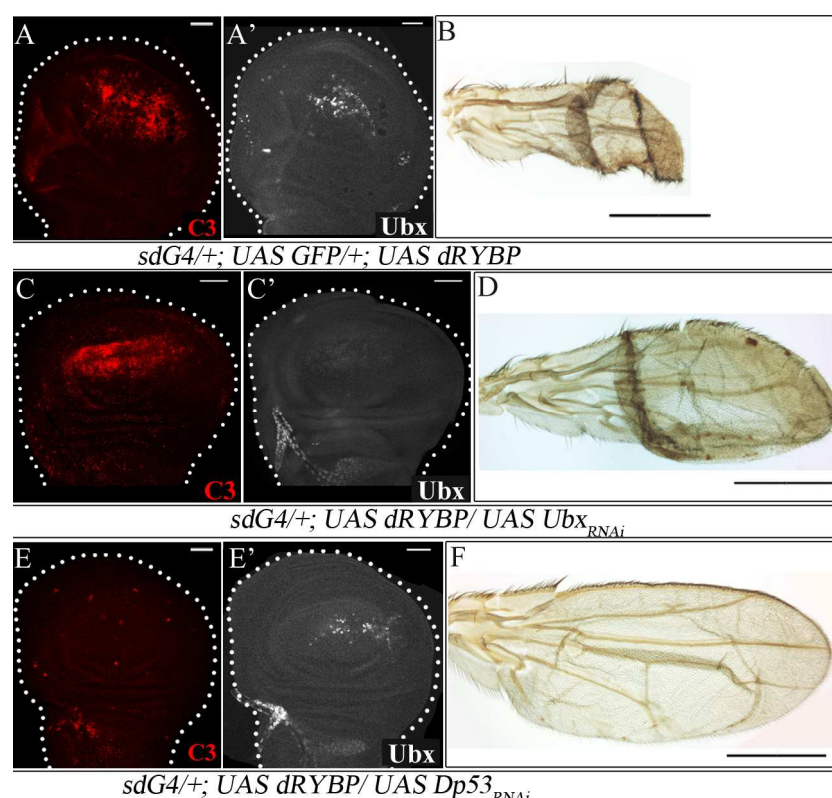


Figura 51: La apoptosis inducida por los altos niveles de dRYBP es dependiente de Dp53.

(A-A') Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dRYBP/+*. **A)** Expresión de C3 (rojo). **A')** Expresión de Ubx (blanco). **B)** Ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS dRYBP/+*. **(C-C')** Disco de ala *sdG4/+; UAS dRYBP/ UAS Ubx_{RNAi}*. **C)** Expresión de C3 (rojo), compárese con (A). **C')** Expresión de Ubx (blanco). Nótese la ausencia de expresión. **D)** Ala *sdG4/+; UAS dRYBP/ UAS Ubx_{RNAi}*. Nótese el aumento de tamaño respecto a (B). **(E-E')** Disco de ala *sdG4/+; UAS dRYBP/ UAS Dp53_{RNAi}*. **E)** Expresión de C3 (rojo). Nótese la reducción de los niveles respecto a (A) y (C). **E')** Expresión de Ubx (blanco). **F)** Ala *sdG4/+; UAS dRYBP/ UAS Dp53_{RNAi}*. Nótese la mejoría de tamaño respecto a (B) y (D). Las barras de calibración representan 50 μ m para los discos y 500 μ m para las alas.

Sabiendo que la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP es dependiente de *Dp53*, se decidió combinar la sobre-expresión de dRYBP con la sobre-expresión de *Sce* y analizar los niveles de apoptosis y los niveles de *Dp53* mediante el estudio de los niveles de C3 y de GFP en discos *sdG4/+; p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/ UAS LacZ* (Figura 52A-A'') en los que solo se sobre-expresa dRYBP y compararlos con los niveles en los discos *sdG4/+ p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/ UAS Sce-FLAG* (Figura 52B-B'') donde se produce la sobre-expresión simultánea de *Sce* y de dRYBP. Los resultados indican que en condiciones de sobre-expresión de dRYBP y de *Sce* se observa una significativa disminución de los niveles de C3 respecto a los niveles que se observan en discos con únicamente altos niveles de dRYBP, y la expresión de GFP está muy disminuida (Figura 52C). Además, esta disminución de la apoptosis también se refleja en el tamaño de los discos ya que son significativamente más grandes en los discos con altos niveles de *Sce* y dRYBP. Estos resultados podrían indicar que el aumento de apoptosis que se produce en los discos *sdG4/+ p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/ UAS LacZ* se debe a que los altos niveles de dRYBP están reclutando los niveles endógenos de *Sce* y que, por ello, se esté “mimetizando”

una falta de función de *Sce*, en la cual, como se ha demostrado anteriormente, se produce una fuerte activación de apoptosis.

En resumen, estos resultados indican que *Sce* y dRYBP interaccionan en el control de la apoptosis controlando los niveles de Dp53.

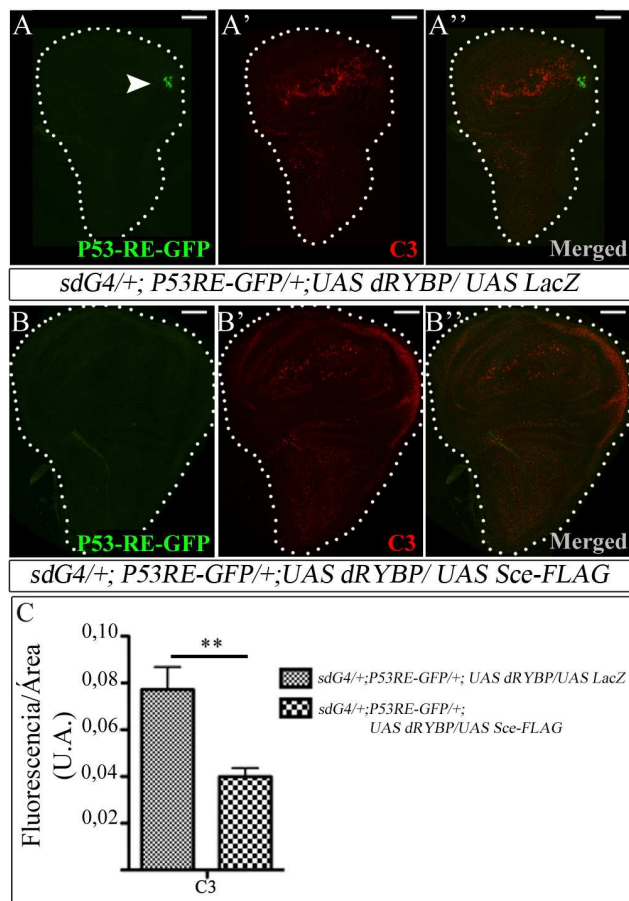


Figura 52: Efecto de la sobre-expresión de *Sce* y dRYBP en la apoptosis inducida por altos niveles de Dp53.

(A-A'') Disco de ala *sdG4/+; p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/UAS LacZ*. **A)** Expresión de GFP (verde, cabeza de flecha). **A')** Expresión de C3 (rojo). **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). **(B-B'')** Disco *sdG4/+ p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/UAS Sce-FLAG*. Nótese la mejoría de tamaño respecto a (A-A''). **B)** Expresión de GFP (verde). Nótese la ausencia de expresión. **B')** Expresión de C3 (rojo). Nótese la disminución de los niveles respecto a (A'). **B'')** Superposición de las imágenes (B) y (B'). **C)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/UAS LacZ* versus *sdG4/+ p53-RE-GFP/+; UAS dRYBP/UAS Sce-FLAG* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m. ** 0,001 < p < 0,01.

3.2.d Altos niveles de *Sce* inhiben apoptosis inducida por estrés

Se decidió analizar la capacidad de *Sce* como inhibidor de apoptosis en condiciones de estrés cuando se irradian las moscas con rayos-X. Debido a que, por razones aún desconocidas, cuando se irradian las larvas no se observa expresión de GFP (datos no mostrados), se utilizó la construcción p53-GFP-FLAG (VDRC #318453, Sarov et al., 2016) para detectar los niveles de DP53. Previamente se comprobó si la construcción p53-GFP-FLAG responde a la irradiación con rayos-X. Como se observa en la Figura 53A-A'' y B-B'', la expresión de GFP aumenta significativamente en los discos imaginales de larvas irradiadas (Figura 53C).

Se irradian larvas *p53-GFP-FLAG/+* como control y se compararon los niveles de C3 como indicador de la apoptosis y de GFP como indicador de los niveles de Dp53 en los discos irradiados de *sdG4/+; p53-GFP-FLAG/+; UAS Sce-FLAG/+* (Figura 53B-D''). Como se observa en la gráfica de la Figura 53E, cuando se sobre-expresa *Sce*, los niveles de C3 disminuyen, indicando que hay menos apoptosis. Además, también se observa que los niveles de GFP disminuyen indicando que también disminuyen los niveles de Dp53. Este efecto también se observa en el tamaño de los discos, ya que discos irradiados *sdG4/+; p53-GFP-FLAG/+; UAS Sce-FLAG/+* son más grandes que los discos irradiados control *p53-GFP-FLAG/+*.

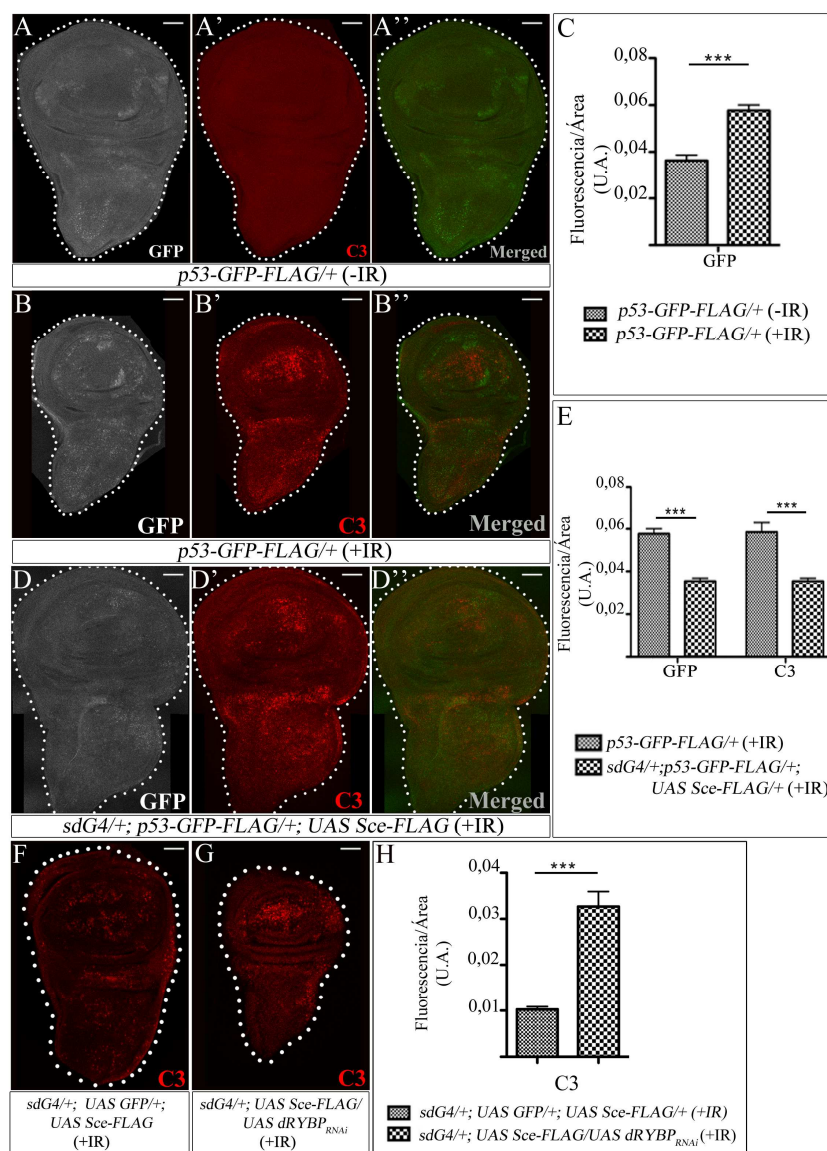


Figura 53: Efecto de la sobre-expresión de Sce en la apoptosis inducida por rayos-X.

(A-A'') Disco de ala *p53-GFP-FLAG/+* sin irradiar. **A)** Expresión de GFP (blanco). **A')** Expresión de C3 (rojo). **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). **(B-B')** Disco de ala *p53-GFP-FLAG/+* irradiado a 4000 Rads. **B)** Expresión de GFP (blanco). Nótese el aumento respecto a (A). **B')** Expresión de C3 (rojo). Nótese el aumento respecto a (A'). **B'')** Superposición de las imágenes B y B'. **C)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de GFP de los discos *p53-GFP-FLAG/+* sin irradiar versus *p53-GFP-FLAG/+* irradiados (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 para cada genotipo). **(D-D'')** Disco de ala *sdG4/+; p53-GFP-FLAG/+; UAS Sce-FLAG/+*. Obsérvese el aumento de tamaño respecto a B-B'. **D)** Expresión de GFP (blanco). Nótese la disminución de expresión respecto a (B). **D')** Expresión de C3 (rojo). **D'')** Superposición de las imágenes (D) y (D'). **E)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de GFP y C3 de los discos *p53-GFP-FLAG/+* irradiados versus *sdG4/+; p53-GFP-FLAG/+; UAS Sce-FLAG/+* irradiados (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 discos para cada genotipo). **F)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce-FLAG/+* irradiado a 4000 Rads. **G)** Expresión de C3 (rojo) en disco de ala *sdG4/+; UAS dRYPB_{RNAi}/+; UAS Sce-FLAG/+* irradiado a 4000 Rads. Nótese la reducción de tamaño respecto a (F). **H)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce-FLAG/+* irradiados versus *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce-FLAG/+* irradiados (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m. *** $p < 0,001$.

Estos resultados muestran que los altos niveles de Sce inhiben la apoptosis inducida por estrés y además son capaces de disminuir la expresión de Dp53 inducida por rayos-X.

Además, se estudió si *dRYBP*, que coopera con *Sce* para modular los niveles de Dp53 (Figura 50), también está implicado en la inhibición de la apoptosis inducida por rayos-X mediada por los altos niveles de *Sce*. Para ello, se compararon y cuantificaron los niveles de expresión de C3 en discos de ala con bajos niveles de *dRYBP* y altos niveles de *Sce* (*sdG4/+; UAS dRYBP_{RNAi}/UAS Sce-FLAG*, Figura 53G) con los discos control (*sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce-FLAG/+*, Figura 53F). Los resultados muestran que los niveles de C3 son significativamente mayores en discos irradiados *sdG4/+; UAS dRYBP_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* que en los discos irradiados control *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Sce-FLAG/+* (Figura 53H). Esto indica por tanto que los altos niveles de *Sce* requieren a *dRYBP* para la inhibir eficazmente la apoptosis inducida por estrés.

3.2.e Altos niveles de *Sce* inhiben apoptosis asociada al crecimiento tumoral

Nuestros resultados indican que el aumento de los niveles de *Sce* en *Drosophila* no resulta perjudicial para el desarrollo, es más, inhibe apoptosis inducida por estrés. Sin embargo en vertebrados, su homólogo RING1B/RNF2 había sido clasificado como oncogén en humanos debido a que se ha visto que sus niveles están elevados en varios tipos de cáncer (Sanchez-Beato et al., 2006). Así pues, se decidió investigar la función de *Sce* en la tumorigénesis de *Drosophila*. Para ello, se estudió el efecto de sobre-expresar *Sce* en dos condiciones distintas en las que se producen crecimientos tumorales en la mosca. Por un lado los tumores neoplásicos inducidos por la falta de función del gen *polyhomeotic* (*ph*) (Classen et al., 2009; Martinez et al., 2009), un regulador epigenético del grupo PcG (Franke et al., 1992) y por otro lado, los tumores hiperplásicos producidos por la sobre-expresión de *abrupt* (Figura 36) (Turek et al., 2013). En ambos tipos de tumores se observan una gran número de células apoptóticas.

Se analizaron los niveles de C3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+* como control (Figura 54A-A') y se compararon con la expresión de C3 en discos donde se sobre-expresa *Sce*, *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* (Figura 54B,B'). Se observó una disminución significativa de los niveles de apoptosis en los discos tumorales (Figura 54C), debido a la inactivación de *ph* que contienen altos niveles de *Sce*. Del mismo modo, al comparar los niveles de C3 en discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+* (Figura 54D-D') con discos *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG* (Figura 54E-E') también se observa una disminución de los niveles de C3 en los tumores inducidos por altos niveles de *abrupt* y conteniendo altos niveles de *Sce* (Figura 54F).

Además, se analizaron los fenotipos de las alas adultas. Las alas de moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+* crecidas a 17°C están muy reducidas (Figura 54G). Sin embargo se observa un rescate de tamaño cuando hay altos niveles de *Sce* en las moscas *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* (Figura 54I). También se observó que los machos *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* son viables a 17°C (Figura 54J), mientras que los machos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+* son letales (Figura 54H). De manera interesante, los discos *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* además de presentar una reducción de los niveles de expresión de C3, también presentan un mayor tamaño en comparación con los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+*, haciendo pensar que quizá se está reduciendo el crecimiento tumoral.

De la misma forma, las alas de las hembras *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+* crecidas a 17°C (Figura 54K) muestran un tamaño más pequeño que las alas de hembras *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG* (Figura 54M). Curiosamente, la letalidad observada en los machos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+* desarrollados a 17°C (Figura 54L) se rescata en presencia de altos niveles de *Sce* *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG* (Figura 54N).

Además, en el caso de *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG* las alas adultas no presentan fenotipos característicos de sobre-crecimientos. Esto lleva a preguntarse si la sobre-expresión de Sce simplemente inhibe apoptosis o si además de manera directa o indirecta controla proliferación para promover la supervivencia del organismo.

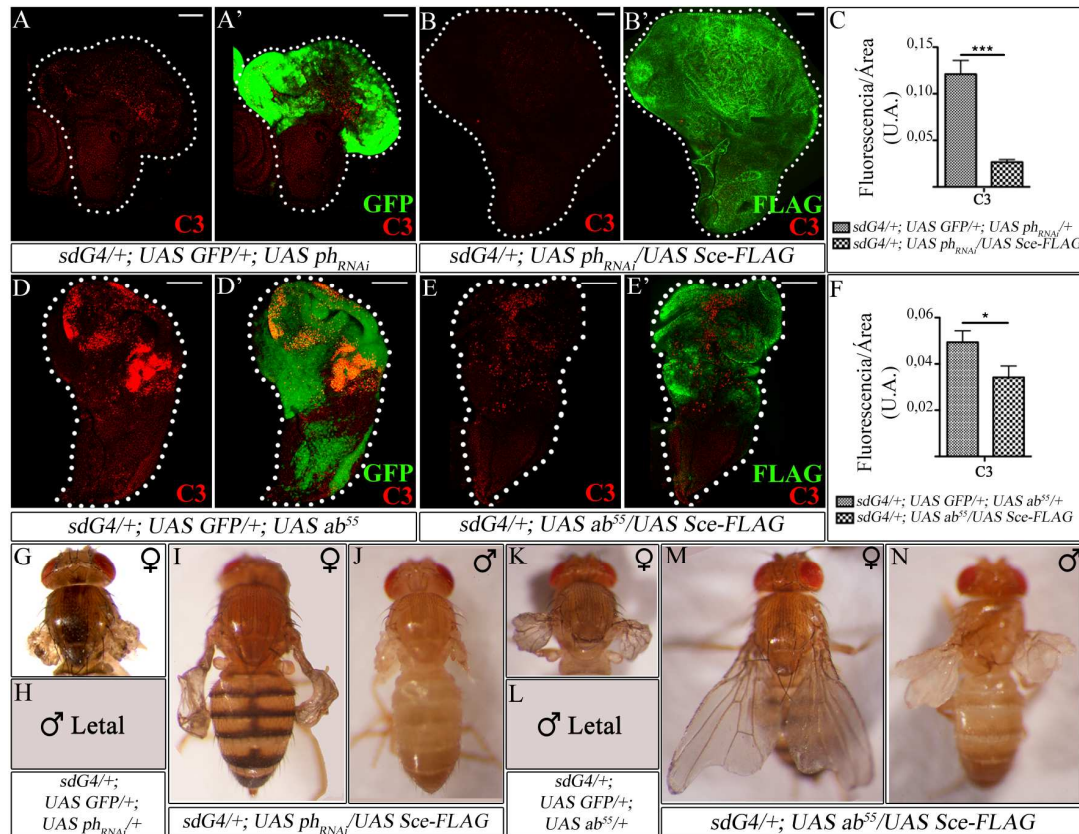


Figura 54: Efecto de la sobre-expresión de Sce en los sobre-crecimientos inducidos por la inactivación de *ph* y la sobre-expresión de *abrupt*.

(A-A') Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+*. Nótese la región del “wing pouch” sobrecrecida. **A)** Expresión de C3 (rojo). **A')** Expresión de GFP (verde) y de C3 (rojo). **(B-B')** Disco de ala *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG*. Nótese el aumento de tamaño respecto a (A-A'). **B)** Expresión de C3 (rojo). Nótese la disminución de los niveles respecto a (A). **B')** Expresión de GFP (verde) y de C3 (rojo). **C)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+* versus *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 para cada genotipo). **(D-D')** Disco *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+*. Nótese la región del “wing pouch” sobrecrecida. **D)** Expresión de C3 (rojo). **D')** Expresión de GFP (verde) y C3 (rojo). **(E-E')** Disco de ala *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG*. **E)** Expresión de C3 (rojo). Nótese la reducción de los niveles respecto a (D). **E')** Expresión de GFP y C3. **F)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de C3 de los discos *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+* versus *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG* (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 para cada genotipo). **(G-H)** Moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ph_{RNAi}/+*. **G)** Hembra. Nótese la reducción de las alas. **H)** Macho. La inactivación de *ph* es letal en machos. **(I-J)** Moscas *sdG4/+; UAS ph_{RNAi}/UAS Sce-FLAG*. **I)** Hembra. Compárese el tamaño de las alas con (G). **J)** Macho. A diferencia de (H), los machos sobreviven y presentan alas de pequeño tamaño. **(K-L)** Moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab⁵⁵/+*. **K)** Hembra. Nótese la reducción en las alas. **L)** Macho. La sobre-expresión de *abrupt* es letal en machos. **(M-N)** Moscas *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/UAS Sce-FLAG*. **M)** Hembra. Compárese el tamaño de las alas con (K) y nótese el rescate de su tamaño. **N)** Macho. A diferencia de (L), los machos sobreviven y presentan alas de pequeño tamaño. Las barras de calibración representan 50 μm para los discos. * 0,01 < p < 0,05, *** p < 0,001.

Resultados del laboratorio indican que la inhibición de la apoptosis mediante la sobre-expresión de DIAP1 o con la inactivación de *Dp53* no rescata ni el tamaño de los discos, ni el

fenotipo de las alas de los individuos adultos (datos no publicados). Por tanto, existen indicios que inducen a pensar que en los rescates observados con la sobre-expresión de Sce no solo se está inhibiendo la apoptosis, si no que los altos niveles de Sce podrían estar promoviendo crecimiento o supervivencia celular.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El desarrollo normal de los organismos, el crecimiento de los tejidos y los órganos que los componen para alcanzar el tamaño y las dimensiones apropiadas, requiere de la correcta acción coordinada de varios procesos que son: el crecimiento celular, la división celular, la apoptosis y la diferenciación terminal (revisado en Conlon & Raff, 1999). Hoy en día, se conocen múltiples vías de señalización implicadas en el crecimiento que, en última instancia, convergen en la regulación del ciclo celular decidiendo si la célula debe crecer y/o dividirse o, por el contrario, ser eliminada. El balance de los procesos de proliferación y apoptosis interviene en el control del tamaño, manteniendo la homeostasis de los tejidos. La importancia de este balance se pone de manifiesto al analizar las consecuencias de su disrupción en el desarrollo tanto morfológico como patológico de los organismos. En este trabajo de Tesis se ha utilizado la mosca *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para analizar los mecanismos y los factores que intervienen en el control del tamaño y, en particular, estudiar el control del tamaño del ala y del halterio. Para ello, se ha analizado la función de los microRNAs *miR-7* y *miR-306*, así como la función del factor de transcripción *abrupt* y de los factores epigenéticos *dBre1* y *Sce* en los procesos de proliferación y apoptosis.

***miR-7* controla el crecimiento del ala**

En este trabajo se ha descubierto que el microRNA *miR-7*, el cual está conservado filogenéticamente, promueve el crecimiento del ala, lo que resulta consistente con los resultados, también de este trabajo, los cuales muestran que *miR-7* se expresa en el disco imaginal de ala (Figura 14C,D). También, en este trabajo se muestra que la falta de función de *miR-7* (Figura 17B-B'') produce alas de menor tamaño que las alas de moscas salvajes (Figura 17C) lo que supone que *miR-7* está implicado en el control de su tamaño.

Análisis previos sobre la función de *miR-7* en el desarrollo de *Drosophila* habían detectado que *miR-7* es requerido para el control de la morfogénesis del ojo, los órganos precursores sensoriales y los órganos reproductores de *Drosophila* (Da Ros et al., 2013; Huang et al., 2013; Li & Carthew, 2005; Li et al., 2009; Pek et al., 2009; Tokusumi et al., 2011; Yu et al., 2009). Sin embargo, su función en el desarrollo del ala solo había sido estudiada mediante experimentos de sobre-expresión (Bejarano et al., 2012; Lai et al., 2005). No obstante, en este trabajo se ha demostrado mediante el análisis estadístico de los tamaños de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* y de los experimentos de rescate que tanto la duplicación genómica de *miR-7*, generada para este trabajo (*Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; P[tub-eGFP-miR-7]^{RC}/+*, Figura 17I), como la sobre-expresión de *miR-7* (*sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}; UAS miR-7-DsRed/+*, Figura 17E) rescatan parcialmente el tamaño del ala de *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, permitiendo concluir que *miR-7* está implicado en el control del tamaño del ala.

El análisis de la expresión mediante experimentos de hibridación *in situ* revelan una expresión débil y ubicua en todo el disco (Figura 14C), a excepción de la región del borde D/V donde se observa una mayor expresión de la sonda (Figura 14D). Experimentos del laboratorio (Aparicio et al., 2015) confirmaron que dicha región del borde D/V correspondía a la zona de las "non-boundary cells". De manera interesante, el borde D/V es uno de los centros organizadores del crecimiento, ya que en concreto, es donde se activa la vía de Notch (de Celis et al., 1996; Herranz & Milan, 2008; Herranz et al., 2008).

El papel de *miR-7* en el desarrollo del ala está ligado al control del tamaño y de la proliferación celular y no al control de la apoptosis, ya que no se detecta expresión de C3 cuando se varían sus niveles de expresión (datos no mostrados). Resultados del laboratorio indicaron que las células del disco de ala deficientes para *miR-7* presentan un retraso en la progresión G1-S del ciclo celular (Aparicio et al., 2015). Además, resultados de esta Tesis demuestran que las células de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* son más pequeñas que las células de las alas salvajes (Figura 18C-F), sin embargo, el tamaño de las células del disco no parece estar afectado (Figura 18A-B).

Se ha descrito previamente que alterar el ciclo celular suele producir una compensación para dar el tamaño esperado del tejido variando el tamaño de las células (Neufeld et al., 1998; Weigmann et al., 1997). No obstante, este no parece ser el caso con las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* ya que son más pequeñas que las alas silvestres y sus células también son más pequeñas. Por consiguiente, estos resultados podrían estar indicando que no solo afecta al tamaño celular sino que también se produce un efecto en el número final de células. A pesar de que el tamaño de las células *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* del disco imaginal de ala no se encuentra aparentemente reducido, el tamaño general del disco sí se encuentra afectado, siendo más pequeño que un disco salvaje como se puede apreciar en la Figura 14B. Además, los experimentos de inducción de clones en el disco (Apéndice 1, Figura A1. 1) mostraron que en un 88% de los casos, los clones de células *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* eran más pequeños o no eran visibles respecto a sus clones gemelos (inducidos al mismo tiempo bajo las mismas condiciones) los cuales expresan *miR-7* en condiciones salvajes. Por tanto, dado que no se detectan diferencias de tamaño celular en los discos *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, resultaría interesante analizar si el número de células totales en los discos *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* se encuentra afectado respecto a los discos control y estudiar otras posibles vías implicadas en el crecimiento como por ejemplo, la vía de Hippo/Salvador/Warts, en las que *miR-7* pudiera estar regulando la expresión de otros genes diana.

Entre los genes putativos que han sido confirmados en otros estudios como genes diana de *miR-7* y que además pudieran estar implicados en el desarrollo del ala, se encuentran los genes del complejo *Enhancer of Split*: efectores de la vía de Notch (Lai et al., 2005; Stark et al., 2003), vía implicada en el desarrollo del ala (de Celis et al., 1996; Rafel & Milan, 2008), *ihog* (*interference hedgehog*) que es el receptor de la vía de Hedgehog (Da Ros et al., 2013), vía también implicada en el desarrollo del ala (Strigini & Cohen, 1997) y *dacapo* (Yu et al., 2009) un inhibidor de Cdk2, que impide la progresión G1-S del ciclo (de Nooij et al., 1996; Lane et al., 1996). Así pues, resultaba interesante estudiar los posibles genes dianas de *miR-7* a través de los cuales podría estar ejerciendo su función en el desarrollo del ala.

***miR-7* controla el crecimiento del ala a través de la vía de Notch, dRYBP y dacapo**

Las estrategias llevadas a cabo en este trabajo para analizar las vías de señalización reguladas por *miR-7* a través de sus genes diana directos han sido: el análisis del fenotipo de falta de función de *miR-7*, la búsqueda de los genes diana en las bases de datos, el análisis de los sensores conteniendo las regiones 3'UTR de los genes diana putativos y el análisis de las interacciones genéticas. Sabiendo que *miR-7* está implicado en el crecimiento del ala y que, además se expresa en el borde D/V de los discos de ala, se analizó la expresión de los

marcadores del D/V: Cut (Ct) y Senseless (Sens) (Herranz & Milan, 2008; Herranz et al., 2008). En los discos de ala *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* se observa una disrupción de la expresión de Ct y de Sens (Figura 15A-D). Por el contrario, en los discos donde se sobre-expresa *miR-7* se observa la desaparición de la expresión de dichos marcadores (Figura 15E-E''), indicando que *miR-7* es requerido para la correcta formación del borde D/V. Sin embargo, ni Ct ni Sens son dianas putativas de *miR-7* (www.microRNA.org), pero sí lo son los genes del complejo *Enhancer of Split* por lo que probablemente, a través de éstos, *miR-7* ejerza su función de regulación del tamaño del ala como ya se había demostrado en el proceso de diferenciación de los órganos cordotonales (Li et al., 2009; Stark et al., 2003). En este trabajo se decidió analizar, entre los más de 150 genes diana predichos de *miR-7* en *Drosophila* (www.mirbase.org) (Brennecke et al., 2005; Stark et al., 2003), la vía de Notch por los fenotipos mencionados anteriormente; dRYBP, por ser un factor epigenético de interés en el laboratorio y por último, *dacapo* por su papel en la regulación negativa de la progresión de la fase G1-S del ciclo, dado que experimentos previos del laboratorio mostraban que esta fase se encuentra afectada en la falta de función de *miR-7* (Aparicio et al., 2015).

En el caso de la vía de Notch, el análisis del efecto en la modulación del tamaño de las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* al disminuir los niveles de *Notch* y de *Cut* (mediante el uso de condiciones heterocigóticas mutantes para estos genes, Figura 20A-F, M) confirma que *miR-7* regula la vía de Notch para controlar el tamaño del ala. Los resultados de esta Tesis junto con los resultados de otros autores en los que se ha mostrado que los genes del complejo *Enhancer of Split* son dianas directas de *miR-7* (Lai et al., 2005; Stark et al., 2003), indican que, al menos a través de la regulación de estos genes, *miR-7* controla la vía de Notch en el disco imaginal de ala.

En el caso de *dRYBP*, el cual se ha visto que su falta de función afecta al tamaño del ala reduciéndolo un 27% (Gonzalez et al., 2008), los experimentos de interacción genética con el mutante heterocigótico *dRYBP¹* revelan un incremento en la Clase 3 de las alas respecto a las alas *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}*, indicando que *dRYBP* coopera en el fenotipo observado en las alas de falta de función de *miR-7* (Figura 20G-I, M). Dado que los resultados de los experimentos con el sensor no resultaron concluyentes (Tesis doctoral Ricardo Aparicio), quizá los ensayos de luciferasa en células S2 de *Drosophila* ayudarían a comprender si *miR-7* regula a *dRYBP* de manera directa o indirecta. La proteína dRYBP es un factor epigenético involucrado en la ubiquitinación de proteínas tanto para su degradación como para su activación (Aparicio et al., 2013; Fereres et al., 2013). Teniendo en cuenta que *miR-7* controla la progresión G1-S del ciclo celular, podría ser que *miR-7* estuviera regulando los niveles de *dRYBP* para controlar la ubiquitinación para degradación vía proteasoma para la regulación de componentes del ciclo celular, o para regular los niveles de activación de la vía de Notch. Esto podría ser ejecutado a través del complejo SCF^{Ago} compuesto por Skp1/Cullin, miembros con los que interacciona dRYBP (Fereres et al., 2013) y la F-box Archipiélago (Ago), del cual se ha descrito que controla los niveles de las proteínas CycE, dMyc y la vía de Notch (Justice & Jan, 2002; Moberg et al., 2001; Moberg et al., 2004). Dado que esta regulación por parte de SCF^{Ago} se encuentra conservada en mamíferos (Koepp et al., 2001; Strohmaier et al., 2001; Welcker et al., 2004 y revisado en Welcker & Clurman, 2008), así como también lo están *dRYBP* y *miR-7*, sería interesante analizar este posible papel de *miR-7* como controlador de los niveles de ubiquitinación durante el desarrollo del ala a través de *dRYBP*.

En el caso de *dacapo*, regulador negativo del ciclo celular, el análisis de la respuesta del sensor a altos niveles de *miR-7* indicó que *miR-7* reprime a *dacapo* (Figura 19). Además, la

interacción genética también apoya este resultado, ya que en las alas *sdG4/+; Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1};UAS *dap^{RNAi}*/+*

Por tanto, la actividad general de *miR-7* estudiada en esta Tesis y por otros autores (Da Ros et al., 2013; Huang et al., 2013; Li & Carthew, 2005; Li et al., 2009; Pek et al., 2009; Tokusumi et al., 2011; Yu et al., 2009) parece estar relacionada con los procesos de proliferación y crecimiento. En conjunto, los resultados de esta Tesis sugieren un posible modelo de actuación de *miR-7* en el control del crecimiento del ala. *miR-7* controlaría la expresión de la vía de Notch como se ha visto en el borde D/V por el efecto sobre Ct y Sens (Figura 15) y en los experimentos de interacción genética con *Notch* y *cut* (Figura 20A-F, M). Los experimentos sobre su efecto sobre los genes del complejo *Enhancer of split* no fueron concluyentes dado que las combinaciones resultaron ser letales. Precisamente, las “boundary cells” inducen un paro en G1-S, junto con *dacapo*, otra de las dianas directas de *miR-7* que también impide la progresión G1-S del ciclo en todas las células, fase en la que se observa un mayor número de células en los discos *Df(2R)exu¹/miR-7^{Δ1}* comparado con células de discos control (Aparicio et al., 2015). De esta forma, *miR-7* regularía la expresión de *dacapo* para controlar la progresión del ciclo en el momento adecuado del desarrollo. Por último, *miR-7* podría regular la expresión de *dRYBP* y la variación de sus niveles, podría incidir en procesos dependientes de la transcripción como la regulación epigenética (Ferreles et al., 2014) o en procesos independientes de la transcripción como el del control de los niveles de proteínas mediante su ubiquitinación y degradación dependiente del proteasoma (Ferreles et al., 2013) (Figura 55).

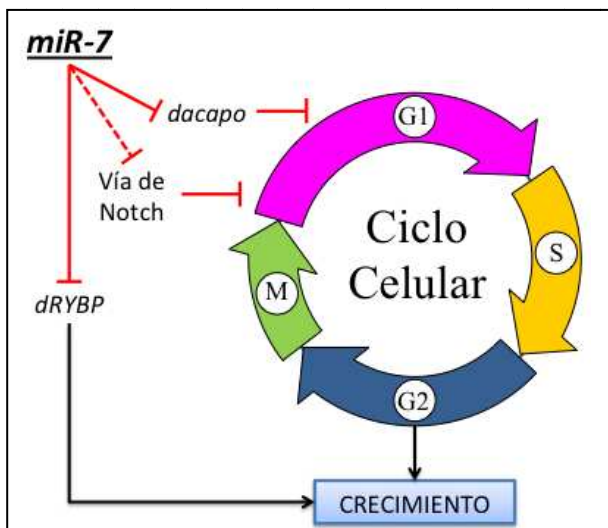


Figura 55: *miR-7* controla crecimiento a través de la regulación del ciclo celular: modelo

miR-7 está regulando crecimiento a través de la regulación, probablemente directa, de la expresión de *dacapo* y de *dRYBP* y, de manera indirecta (línea discontinua), la expresión de los genes de la vía de Notch como *Cut*, *Senseless* y *Notch*. La función de tanto *dacapo* como la vía de Notch incide sobre la progresión del la fase G1-S del ciclo, mientras que el papel de *dRYBP* podría ser independiente al ciclo celular.

Encontrar nuevos genes diana implicados en la regulación del crecimiento del disco de ala sería interesante para comprender mejor la red de genes que controla *miR-7* en el ala. Además, *miR-7* es un microRNA conservado a lo largo de la evolución y muy estudiado del cual no solo se han descrito papeles en el desarrollo de distintos tejidos como el cerebro o el páncreas de humanos, sino también en patologías como diversos tipos de cáncer y la diabetes (revisado en Horsham et al., 2015).

***miR-306* controla el tamaño del ala**

miR-306 es un microRNA conservado en los insectos y prácticamente en todo el género *Drosophila* (www.mirbase.org). A pesar de haber sido detectada su expresión en varias especies de insectos (Ge et al., 2013; Jagadeeswaran et al., 2010; Macedo et al., 2016; Ylla et al., 2016), apenas se conocen detalles sobre su función. Únicamente en *Drosophila melanogaster*, en la que se ha descrito su función en el control de la expresión del gen *bag of marbles* para que ocurra la correcta diferenciación terminal de las espermátidas (Eun et al., 2013).

Resultados previos del laboratorio mediante experimentos de hibridación *in situ*, mostraron que *miR-306* se expresa ubicuamente en el disco imaginal del ala (Aparicio, Redondo *et al.* sin publicar), sugiriendo que podría tener una función en el desarrollo del ala. De hecho, los resultados de esta Tesis indican que *miR-306* se requiere para controlar el tamaño del ala (Figura 24A-E) como se refleja en la disminución del 10% del tamaño que se observa en la deficiencia *miR-306-79-9b-KO* (Chen et al., 2014) (Figura 24D-E) o del 27% en las alas donde la función de *miR-306* se inactiva mediante el uso de la esponja (Eun et al., 2013) (*UAS GFP-miR-306sp/+; daG4/UAS GFP-miR-306sp*) (Figura 24B-C). Además, se ha observado que esta disminución del tamaño del ala es una consecuencia de la reducción del tamaño celular (Figura 24F-H), sugiriendo un posible papel en el control del crecimiento.

Resulta curioso que la utilización de la esponja produzca una reducción bastante más significativa que la deficiencia genómica *miR-306-79-9b-KO*, sugiriendo que los microRNAs *miR-79* y *miR-9b* pertenecientes al mismo clúster o grupo (Figura 22), también delecionados en la deficiencia *miR-306-79-9b-KO*, podrían estar modulando de una forma u otra el tamaño del ala, dando robustez al control del proceso del crecimiento.

Así como la inactivación de la función de *miR-306* no induce muerte celular (datos no mostrados), los resultados de este trabajo indican que su sobre-expresión induce altos niveles de apoptosis en el disco de ala (Figura 26A-A''), la cual es rescatada tanto en presencia de altos niveles del inhibidor de apoptosis, DIAP1 (Figura 26B-C), como en ausencia de *Dp53* (Figura 26D-E). La dependencia de *Dp53* viene también apoyada por la observación de que la sobre-expresión de *miR-306* activa la expresión del reportero P53-RE-GFP, el cual no se expresa en el disco imaginal de ala en condiciones normales (Figura 26F) y solo responde a la presencia de altos niveles de *Dp53* (Figura 26G). Esta fuerte activación de la apoptosis no solo reduce considerablemente el tamaño del ala y del halterio (Figura 25A-F,I), sino además se observó que las alas presentan un acortamiento de la vena L5 (85%) y defectos en las intervenas. Curiosamente, se observó que la inactivación de *Dp53* en las alas adultas, a pesar de no rescatar el tamaño producido por la sobre-expresión de *miR-306*, disminuye el porcentaje de alas que presentan la vena L5 truncada (47%), relacionando en parte y como se menciona en este apartado, los fenotipos de sobre-expresión de *miR-306* con los niveles de *Dp53* (Apéndice 2, Figura A2. 1). Adicionalmente, otro de los fenotipos relacionados con la sobre-expresión de *miR-306* es el tamaño de las células de las alas, las cuales son mayores que las células de las alas salvajes (Figura 25J-K). Este aumento de tamaño celular podría ser efecto de la combinación, por un lado, de las células supervivientes como respuesta a los altos niveles de apoptosis en un intento de compensar la pérdida celular, y por otro lado, de los defectos en la progresión del ciclo que se observan (Figura 39).

En conjunto, los resultados de esta Tesis indican que *miR-306* podría estar regulando negativamente a genes que controlan la apoptosis, genes que controlan el tamaño del ala y del halterio, el tamaño de sus células, así como el desarrollo de la vena L5. De manera importante, estos fenotipos son rescatados parcialmente en condiciones de débil sobre-expresión de *miR-306* (25°C, para evitar la fuerte activación de apoptosis), en un fondo mutante para *miR-306* (*sdG4/+; miR-306-79-9b-KO; UAS miR-306²⁰-DsRed/+*) (Figura 25H-I), resaltando una vez más que *miR-306* se requiere para el correcto desarrollo del ala.

miR-306* regula la expresión de *abrupt

El análisis de los posibles genes diana de *miR-306* indica que *abrupt* es una diana directa de este microRNA, ya que los altos niveles de *miR-306* reprimen la expresión del sensor 3'UTR de *abrupt* (Figura 27) y, además, la sobre-expresión de *miR-306* reprime la expresión de *abrupt* detectada con el anticuerpo (Figura 28). Cuando se analizó la interacción genética entre *abrupt* y *miR-306* se observó que las alas *ab¹/+; miR-306-79-9b-KO/+* presentan un tamaño similar a las alas *ab¹* homocigóticas (Figura 30), indicando que el alelo salvaje de *miR-306* es capaz de regular la expresión del alelo salvaje de *abrupt*.

Por último, la sobre-expresión de *miR-306* induce el truncamiento de la vena L5 de forma similar a la que se observa cuando se inactiva la función de *abrupt* (Hu et al., 1995; Morgan et al., 1925), Figura 29A). Cabe destacar que no se han predicho sitios de unión en *abrupt* para los microRNAs *miR-9c*, *miR-79* y *miR-9b*, indicando que *miR-306* sería el único microRNA del clúster que podría estar regulando a *abrupt*.

Así pues, *miR-306* podría estar controlando en parte el tamaño del ala y halterio a través del control de la expresión de *abrupt*, revelando además una nueva función, hasta ahora no descrita, de este factor de transcripción en el control del tamaño del ala y del halterio (Figura 56).

***abrupt* controla el tamaño del ala**

Aunque la función de *abrupt* que codifica un factor de transcripción de la familia de proteínas BTB-ZF, ha sido descrita en múltiples procesos como la especificación de la vena L5, en el desarrollo de neuronas y motoneuronas o en la formación del ovario de *Drosophila* (Hattori et al., 2013; Hu et al., 1995; Jang et al., 2009; Li et al., 2004; Sugimura et al., 2004), hasta ahora no se había descrito su implicación en el desarrollo de los discos imaginales salvo en condiciones de sobre-expresión, donde se observaron crecimientos hiperplásicos en los discos de ojo y antena (Grieder et al., 2007; Turkel et al., 2013). Sin embargo, su papel en el desarrollo de los discos de ala y halterio parece haber pasado desapercibido a pesar de presentar una clara expresión en todo el territorio de estos discos (Figura 28A). En este trabajo, se reporta por primera vez, la disminución del tamaño del ala y del halterio que presentan las diferentes mutaciones del gen *abrupt*. Es destacable que el tamaño de los discos imaginales del ala y del halterio está claramente reducido en condiciones de falta de función de *abrupt* (Figura 29). En el caso del alelo hipomorfo *ab¹*, además de presentar el clásico acortamiento de la vena L5, muestran una suave pero significativa reducción del tamaño de las alas del 6,5% (Figura 29A-B). Además, las mutaciones *ab^{clu-1}* (Vactor et al., 1993) y *ab^{EY011129}* presentan una reducción del tamaño del ala del 14% y 22% respectivamente (Figura 29B), y la inactivación de su expresión mediante el uso de la línea *UAS ab_{RNAi}* (#HMS00369), el cual

elimina la expresión de *abrupt* eficientemente (Figura 29G), muestra una reducción del tamaño del ala del 20% (Figura 29K). La disminución de tamaño observada en el mutante es rescatada por una duplicación genómica de *abrupt*, como se observa en las alas *ab¹; ab-GFP/+* (Figura 29C-D), las cuales presentan un rescate de tamaño, indicando la importancia de los niveles de *abrupt* para el correcto desarrollo del ala. De manera interesante, esta disminución observada en las alas, no está relacionada con la activación de la apoptosis (datos no mostrados) y la inactivación de *Dp53* tampoco rescata los defectos asociados a la inactivación de *abrupt* (apéndice 3, Figura A3. 1). Asimismo, los resultados indican que la falta de función de *abrupt* disminuye el tamaño del ala mediante la reducción del tamaño de las células (Figura 37). Estos datos refuerzan la idea de que *abrupt* cumple un papel en el control del tamaño del ala.

***abrupt* controla el tamaño del halterio**

En este trabajo de Tesis, se ha descubierto que *abrupt* no solo controla el desarrollo del ala, sino también el del halterio. La inactivación de la función de *abrupt* produce una reducción del tamaño del halterio, el cual adicionalmente presenta una muesca longitudinal que confiere la apariencia de un corazón (“halterios corazón”), nombre que se le ha dado a dicho fenotipo (Figura 29F,J). La mayoría de los genes que se expresan en el ala, también lo hacen en el halterio. Sin embargo, lo que define la identidad de halterio es la expresión diferencial del gen *Ultrabithorax* (*Ubx*). Además, la modulación de los niveles de *Ubx* modifica el tamaño del halterio de forma que los altos niveles de *Ubx* producen una disminución del tamaño del halterio (Smolik-Utlaut, 1990) y la inactivación produce una transformación hacia ala (Lewis, 1978) (Figura 5).

Los resultados de esta Tesis indican que tanto los bajos como los altos niveles de *abrupt* no afectan directamente la expresión de *Ubx* en el halterio (Figura 35F-G’). Los análisis de interacción genética entre *ab* y *Ubx* revelan que la inactivación de la función de *Ubx* rescata parcialmente la inactivación de *abrupt* (*ab¹; Ubx¹³⁰/+*) dado que se obtienen halterios de mayor tamaño y disminuye el porcentaje de “halterios corazón” (Figura 35A-C). Esto podría sugerir que en ausencia de *abrupt* aumentan los niveles de *Ubx*, es decir, que *abrupt* regularía la expresión de *Ubx*. Sin embargo, este no es el caso cuando se analiza la expresión de *Ubx* en ausencia de *abrupt* (Figura 35F-G’). Por otro lado, los halterios transformados hacia alas en las moscas *sdG4/+; UAS Ubx_{RNAi}/UAS ab_{RNAi}* son más pequeños que los halterios transformados hacia ala en moscas *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS Ubx_{RNAi}/+* (Figura 35D-E) sugiriendo que *abrupt* junto con *Ubx* son necesarios para el crecimiento del halterio.

Previamente en una búsqueda de genes regulados por *Ubx* en el halterio, se ha descrito que los niveles del ARNm de *abrupt*, a diferencia de otros genes implicados en la especificación de las venas, aumentan cuando se elevan los niveles de *Ubx*, sugiriendo que *Ubx* podría estar regulando positivamente la expresión de *abrupt* en el halterio (Pavlopoulos & Akam, 2011). Por tanto, en conjunto los resultados, podrían apuntar a una posible cooperación entre *abrupt* y *Ubx* bien directa o bien a través de otros factores también regulados por *Ubx* para determinar el tamaño del halterio. Sería interesante analizar la relación entre *abrupt* y genes implicados en el crecimiento del halterio como *Dpp* (el cual se encuentra afectado en ausencia de *abrupt*, Figura 29N-O) u *Optomotor-Blind* (*Omb*) entre otros, así como analizar la expresión de *abrupt* en condiciones de sobre-expresión de *Ubx*. Del mismo modo, resultaría interesante estudiar la interacción entre *abrupt* y *Ubx* durante el desarrollo pupal. Dado que se ha descrito

que la expresión de *abrupt* en el ala disminuye durante el desarrollo pupal (Caygill & Johnston, 2008), quizá, a falta de conocer si *ab* disminuye o no sus niveles en el halterio durante el estadio pupal, *Ubx* pudiera estar manteniendo la expresión de *abrupt*, indicando que dicha interacción podría estar ocurriendo más tarde durante el desarrollo.

Debido a la peculiar forma que presentan los “halterios corazón”, se podría pensar que la falta de *abrupt* afecta más a un compartimento que a otro en el halterio. Sin embargo, resultados de esta Tesis indican que la inactivación de *abrupt* en el halterio y el fenotipo de “halterio corazón” están relacionados con una reducción de tamaño que afecta de manera proporcional, tanto al compartimento anterior como al posterior (Figura 32 y Figura 33). Se observa la expresión de los reporteros *ptc*-DsRed y *hh*-DsRed en los discos de ala y halterio con bajos niveles de *abrupt* pero no se aprecian grandes cambios en la expresión debido a que, también, el tamaño de las regiones del “pouch” están proporcionalmente reducidas. Por tanto, el efecto de inactivar *abrupt* en los discos produce una reducción de tamaño general y no resulta en la desaparición o reducción de un compartimento en concreto (Figura 32 y Figura 33).

Resulta curioso que en los halterios de la mosca, la expresión de *hh*-DsRed se encuentra prácticamente eliminada (Figura 33D). Esto podría indicar que, o bien, esas células se eliminan durante el periodo pupal, o bien, a falta de reporteros que se expresen en todo el compartimento anterior (hasta ahora no se han encontrado otros que puedan visualizarse en el halterio maduro), la eliminación de células durante el estadio pupal ocurre de forma proporcional en ambos compartimentos. Es decir, quizá con otro marcador que ocupe todo el compartimento anterior (por ejemplo, *cubitus interruptus*) se observaría una mayor disminución de expresión en el compartimento anterior que la observada con *ptc*-DsRed, la cual está también afectada pero en menor medida (Figura 33C). Además, no hay que olvidar que el tamaño del compartimento posterior es aproximadamente un 30% del tamaño de todo el halterio, por lo que a pesar de ser una disminución proporcional, la porción posterior siempre aparentará una mayor disminución. Por otro lado, el análisis de los tamaños de los halterios transformados a alas en ausencia de *abrupt* (*ab*¹; *bx*³/*Ubx*¹³⁰ y *ab*¹; *pbx*¹/*Ubx*¹³⁰) revelan que las células, especialmente las del compartimento posterior, no son del todo eliminadas durante el desarrollo pupal ya que existen suficientes células para que tenga lugar la transformación (Figura 34). Además, la reducción proporcional del compartimento anterior y del compartimento posterior se refleja en el tamaño de las transformaciones hacia ala, dado que en ambos casos las transformaciones que tienen lugar son más pequeñas en comparación con las transformaciones control (Figura 34).

Con todo, resultaría muy interesante obtener nuevos reporteros que puedan ser estudiados tanto en el disco como en el halterio adulto para continuar analizando la disminución general de tamaño y determinar si hay una población celular más afectada que otra, así como visualizar el crecimiento dependiente de *abrupt* de los compartimentos del halterio durante el desarrollo pupal.

La modulación de los niveles de *Abrupt* afecta la progresión del ciclo celular

La reducción del tamaño del ala y los halterios, y al mismo tiempo, la reducción del tamaño celular debido a la inactivación de *abrupt*, sugerían un posible efecto en la progresión del ciclo celular. Desafortunadamente, los experimentos de FACS no resultaron concluyentes, por lo que se utilizó el análisis de la expresión del reportero Fly-Fucci-GFP, marcador de la fase G1, G2 y M (Zielke et al., 2014); de PCNA-EmGFP, marcador de la fase S (Swanhart et al., 2007); y PH3, marcador de la fase M. El análisis de la expresión de estos reporteros sugiere que tanto la inactivación (Figura 38) como la sobre-expresión de *abrupt* (Apéndice 3, Figura A3. 2) altera la progresión del ciclo celular, resaltando la importancia de los niveles de *abrupt* en el control del crecimiento.

En el caso de la inactivación de *abrupt*, los resultados indican que se podría estar produciendo un retraso en la fase G1. Esto haría progresar el ciclo más rápido en el resto de fases a modo compensatorio (Neufeld et al., 1998) ya que la expresión de Fly-Fucci-GFP se encuentra disminuida y la expresión de los reporteros tanto de la fase S como de la fase M parecen estar aumentados cuando se comparan con discos control (Figura 38).

Curiosamente, el análisis de estos marcadores en condiciones de sobre-expresión de *miR-306*, el cual mimetiza una condición de inactivación de la función de *abrupt*, detecta efectos similares con el Fly-Fucci-GFP (Figura 39A-A''), es decir, una disminución de la expresión de GFP (Figura 39B-B''). Sin embargo, la expresión de PCNA-EmGFP se encuentra aumentada, quizá debido a que *miR-306* tenga más genes diana implicados en la progresión del ciclo celular y que no han sido estudiados en este trabajo de Tesis.

La sobre-expresión de *CycD-Cdk4* y *CycE* rescatan parcialmente los fenotipos asociados con la inactivación de *abrupt*.

Debido a los efectos que la inactivación de *abrupt* produce en el tamaño de los apéndices de ala y halterio y en la progresión del ciclo celular, en este trabajo de tesis se ha iniciado el análisis de las interacciones genéticas de *abrupt* con componentes del ciclo. Previamente, otros autores habían mostrado experimentos de "RNAseq" en los que *abrupt* activa la expresión de *Cdk4*, *Cdk2* y *dMyc* (Turkel et al., 2013). Estos datos junto con los resultados de este trabajo, los cuales indican que *abrupt* podría estar regulando la progresión de G1 donde actúan *CycD-Cdk4*, *CycE-Cdk2* y que el tamaño de las células de alas mutantes para *abrupt* están disminuidas como ocurre en los mutantes para *dMyc* (Figura 42A, Johnston et al., 1999), han hecho que el estudio de la función de *abrupt* se haya centrado en el análisis del complejo Ciclina D-Cdk4, de Ciclina E y de *dMyc*.

Los resultados de esta Tesis muestran que la sobre-expresión de *CycD-Cdk4* produce un rescate en la expresión de los reporteros *ptc-DsRed* y *hh-DsRed*, tanto en el tamaño como en la forma de los halterios resultantes de la inactivación de *abrupt* (Figura 40C-D). En el caso de *CycE*, a pesar de apreciar un aumento en el número de células expresando ambos reporteros, no se observó un cambio respecto a los fenotipos de "halterio corazón". Quizá esto se deba, en parte, a que la sobre-expresión de *CycE* sin combinarlo con la sobre-expresión de *Cdk2* tenga limitada su capacidad para promover la progresión del ciclo y, que por ello, no se vea un rescate en la morfología, aunque sí parcialmente en el tamaño de los compartimentos (Figura

40G-H). Resultaría interesante emplear la sobre-expresión del recombinante *CycE-Cdk2* para comparar los resultados obtenidos.

Por otra parte, el tamaño de las alas con bajos niveles de *abrupt* también se rescata cuando se sobre-expresa *CycD-Cdk4* y *CycE* (Figura 41). Además, la sobre-expresión de *CycE* rescata el truncamiento de la vena L5 observada en la falta de función de *abrupt* (Apéndice 3, Figura A3. 3D). También, se ha observado que la inactivación de *dacapo*, represor de *CycE-Cdk2* y por tanto inhibidor de la progresión de G1-S, produce un aumento del tamaño del ala de igual manera que la sobre-expresión de *CycE* (Figura 41) y una disminución del porcentaje de venas L5 truncadas respecto a la inactivación de *abrupt* (Apéndice 3, Figura A3. 3D), apoyando los resultados obtenidos con *CycE*.

Por tanto, estos resultados sugieren, a falta del análisis de las interacciones utilizando la falta de función de *CycD-Cdk4* y *CycE-Cdk2* junto con marcadores de su expresión que *abrupt* podría estar regulando la expresión de estas ciclinas para permitir el progreso del ciclo celular, en concreto la progresión de la fase G1-S.

Por otro lado, el análisis de la interacción con *dMyc* se está llevando a cabo, aunque por el momento los resultados no son concluyentes. Aun así, resulta interesante que la sobre-expresión de *dMyc* a 25°C junto con la inactivación de *abrupt* no rescate el tamaño de las alas que produce solo la inactivación de *abrupt* (Figura 42), indicando que quizá *dMyc* requiere a *abrupt* para promover crecimiento. Téngase en cuenta que este experimento tuvo que ser llevado a cabo a 25°C, dado que a 29°C las moscas *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab^{RNAi}/+* resultaron ser letales frente a la sobre-expresión de *dMyc* que *per sé* no produce letalidad, aunque las alas presentan una reducción de tamaño (Apéndice 3, Figura A3. 3B-C).

Estos resultados, aunque preliminares, podrían estar apuntando hacia una posible relación no lineal entre *abrupt* y *dMyc*. Cabe destacar que se ha descrito que *dMyc* puede promover la transcripción de los genes *CycE*, *CycD* y *Cdk4* en el borde D/V del disco imaginal de ala (Duman-Scheel et al., 2004). A su vez, en mamíferos se ha visto que C-MYC es capaz de promover la transcripción de los genes *CYCD2*, *CYCE* y *CDK4* (Bouchard et al., 1999; Hermeking et al., 2000; Perez-Roger et al., 1997). Adicionalmente, se ha descrito en mamíferos que MYC es capaz de interaccionar con MIZ-1 (Myc-interacting zinc finger protein), una proteína BTB-ZF con la que se asocia para activar la transcripción de genes y que no se encuentra conservada en *Drosophila* (Wiese et al., 2013). De esta manera, sería interesante analizar si la relación de *dMyc* con las proteínas BTB-ZF se encuentra conservada en *Drosophila* a través de una posible interacción entre *dMyc* y *abrupt* para promover la transcripción de las Ciclinas D-Cdk4 y *CycE-Cdk2*.

Los resultados del análisis de función de *miR-306* y de su diana *abrupt* en el control del tamaño de los apéndices permiten proponer un modelo muy preliminar en el que el eje regulador *miR-306-abrupt* controla el tamaño de los apéndices mediante la regulación del ciclo celular. (Figura 56).

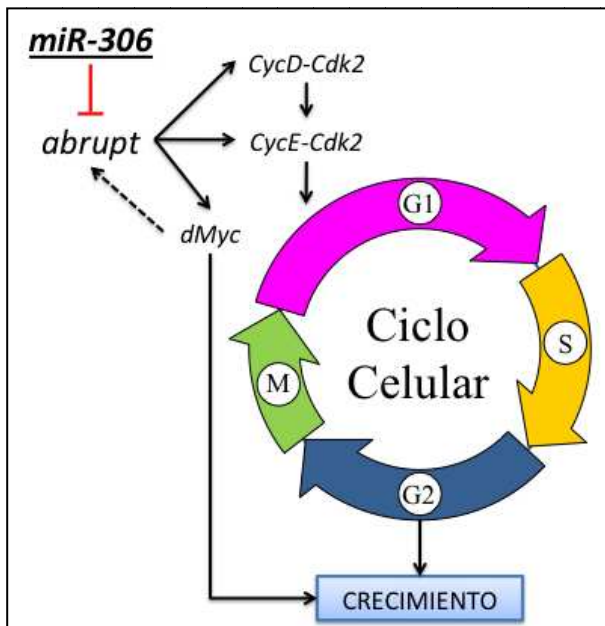


Figura 56: El eje *miR-306-abrupt* en el control del tamaño a través de la regulación de la progresión del ciclo: modelo

miR-306 controla, probablemente de manera directa, la expresión del factor de transcripción *abrupt*. A su vez, el factor de transcripción *abrupt* podría estar regulando por un lado, la expresión del complejo *Ciclina D-Cdk4*, que actúa como sensor del crecimiento y que promueve indirectamente la activación del complejo *CycE-Cdk2*. Por otro lado *abrupt* también promovería la expresión del complejo *CycE-Cdk2*, el cual es el factor limitante para la progresión G1-S del ciclo. Y, por último, otro posible gen diana de *abrupt* sería el oncogén *dMyc*, el cual está implicado en el control del crecimiento, y que además, podría estar regulando la expresión de *abrupt*.

Regulación de la muerte celular mediada por los factores epigenéticos dBre1 y Sce

Se está solo en el inicio de entender al amplio efecto de los microRNAs en el desarrollo, en la fisiología y en la etiología de las enfermedades. La competencia que los microRNAs tienen para regular a un gran número de ARNm de una forma muy determinada, otorga a estas moléculas una gran capacidad funcional en los contextos celulares tanto normales como en los anómalos. La biología del microRNA *miR-7* es compleja y se ha determinado que tiene importantes funciones en el desarrollo normal y patológico (revisado en Horsham et al., 2015). Aunque se ha progresado mucho en el entendimiento de la función de este microRNA en las enfermedades con las que se le ha relacionado, su función en el desarrollo normal está todavía por definir.

Así como existen numerosos trabajos describiendo las posibles funciones de *miR-7*, fundamentalmente en vertebrados, poco o nada se sabe de la función del *microRNA-306*, el cual también ha sido objeto de estudio de este trabajo. Los resultados de esta Tesis contribuyen al descubrimiento de la función de este microRNA y en la regulación de la expresión de *abrupt*, un factor de la familia BTB-ZF con relevantes funciones en el desarrollo y la fisiología de los animales (revisado en Chevrier & Corcoran, 2014; Siggs & Beutler, 2012).

En general, este trabajo de Tesis ha contribuido al esclarecimiento del papel que ejercen los microRNAs en el desarrollo. Futuros experimentos usando *Drosophila* como sistema modelo generarán evidencias funcionales que ayudarán a obtener una visión más integradora de sus mecanismos de acción así como de los procesos y vías de regulación en los que están implicados, que tanto en el caso de *miR-7* como en el de *miR-306* es la regulación del crecimiento.

Otro de los procesos en los que los microRNAs parecen estar ejerciendo su función, y que está siendo estudiado en el laboratorio, es la regulación epigenética de la expresión génica mediada por las proteínas Polycomb y trithorax, donde, por ejemplo en mamíferos, ya se ha

visto el requerimiento de las proteínas Argonauta 1 y 2 para el procesamiento de los microRNAs, en concreto, para la di-metilación de la histona H3K9 para el silenciamiento génico (Janowski et al., 2006; Kim et al., 2006). Tras proponerse la existencia de un circuito regulado de PcG-microRNAs, poco a poco se van obteniendo nuevos datos sobre esta vía de regulación de la expresión génica (revisado en Sato et al., 2011).

Para poder definir el papel de los microRNAs en la regulación de la expresión de los componentes epigenéticos, primero era necesario analizar en detalle los procesos en los que las proteínas PcG y trxG están implicados. En este trabajo de Tesis se decidió estudiar la función que ejercen las proteínas dBre1 y Sce junto a dRYBP en el proceso de apoptosis y, en particular, en la muerte celular dependiente de Dp53.

Tanto dBre1 como Sce son E3-ubiquitin ligasas que interaccionan con dRYBP, un factor epigenético con capacidad de promover la ubiquitinación de proteínas (Aparicio et al., 2013; Fereres et al., 2013; Gonzalez & Busturia, 2009). Estos tres factores epigenéticos tanto, en *Drosophila* como en humanos, presentan sitios de unión para múltiples microRNAs según los estudios bioinformáticos (www.microRNA.org).

Los resultados de esta Tesis sobre el análisis de la función de *dBre1* en la muerte celular dependiente de *dRYBP* y de *Dp53* no se han concluido por el momento. Aunque los resultados indican que *dBre1* podría tener una función anti-apoptótica dependiente de *Dp53*, sería necesario realizar más experimentos para poder evaluar su dependencia de los niveles de *Dp53* y el papel de *dRYBP* en dicha apoptosis. Sin embargo, como se discute a continuación, el estudio de la función de *Sce* en la apoptosis dependiente de *Dp53* ha resultado en el descubrimiento de la función apoptótica de esta proteína.

Los bajos niveles de *Sce* promueven apoptosis en el ala dependiente de los niveles de *Dp53*

Los resultados de esta Tesis indican que la falta de función de *Sce* produce una fuerte activación de la apoptosis en el disco imaginal de ala (Figura 47B'). Además, como se había descrito previamente, se observa la expresión de Ubx debido a su función en el silenciamiento de los genes homeóticos (Figura 47B) (Gutierrez et al., 2012; Oktaba et al., 2008). Seguramente, debido a esta expresión de Ubx, su función en la apoptosis había pasado desapercibida hasta este estudio. En este trabajo también se demuestra que la apoptosis inducida por la inactivación de *Sce* es independiente de la expresión ectópica de Ubx (Figura 47D-E). Por tanto, los resultados revelan que *Sce* tiene una función anti-apoptótica que hasta ahora no había sido descrita. De manera importante, esta función es dependiente de la función de *Dp53*, tal y como muestran los datos cuando se inactiva la función de *Dp53* (Figura 47F-G) y se analiza la activación del reportero P53-RE-GFP (Figura 48C), el cual solo responde cuando se elevan los niveles de *Dp53* (Figura 44A-A'')(Wylie et al., 2014).

Los altos niveles de *Sce* inhiben la apoptosis dependiente de *Dp53* y para ello requiere a *dRYBP*

Resulta interesante que los altos niveles de *Sce* no producen ningún efecto ni el disco imaginal de ala ni en las alas de las moscas, indicando que el aumento de expresión de *Sce* no resulta tóxico para la célula (Figura 49A-B) y, además, son capaces de reducir la apoptosis producida por los altos niveles de *Dp53* (Figura 49C',E',G) e incluso disminuir los niveles

celulares de Dp53 (Figura 49C'',E'',G) y para ello requiere a la proteína dRYBP (Figura 50). Estos resultados sugieren que tanto la falta como la sobre-expresión de Sce tienen un fuerte papel anti-apoptótico. Este papel anti-apoptótico de Sce es observable tanto en condiciones de sobre-expresión de Dp53 como en condiciones de estrés inducido por rayos-X. Resultaría interesante analizar el efecto de los altos niveles de Sce en más condiciones de estrés que activen la apoptosis para analizar con más detalle su efecto anti-apoptótico y definir sus mecanismos de acción.

La sobre-expresión de dRYBP induce apoptosis (Gonzalez & Busturia, 2009) que es dependiente de los niveles de Dp53, es decir, en ausencia de *Dp53* se rescata la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP (Figura 51). Durante este trabajo, se ha descubierto que la sobre-expresión de Sce rescata la apoptosis inducida por los altos niveles de dRYBP y lo hace a través de la reducción de los niveles de Dp53 sugiriendo, de nuevo, que los altos niveles de Sce reducen los niveles celulares de Dp53 y, por tanto, inhiben la apoptosis (Figura 52).

Estos resultados inducen a pensar cuál es el mecanismo por el que la sobre-expresión de dRYBP induce apoptosis. Se podría pensar que los altos niveles de dRYBP promueven apoptosis mediante el secuestro, entre otras de las proteínas con las que interacciona, de Sce, lo cual mimetizaría su inactivación, y por tanto produciendo niveles elevados de Dp53, de la misma manera que ocurre al inactivar la función de Sce. En las células de mamíferos se ha descrito que la sobre-expresión de dRYBP induce apoptosis en las células transformadas pero no en las células salvajes (Danen-van Oorschot et al., 2004). Precisamente en mamíferos, se sabe que la principal E3-ubiquitin ligasa reguladora de la expresión de P53 es MDM2. Se ha descrito cómo dRYBP interacciona con MDM2 para impedir que poli-ubiquitine a P53 y por tanto evitando que P53 sea degradado vía proteasoma (Chen et al., 2009). Resulta muy interesante que MDM2 a pesar de estar conservada en la evolución, no se han descubierto posibles homólogos ni en *Drosophila* ni en *C.elegans* (Lane & Verma, 2012). Hasta ahora, en *Drosophila* se ha descrito el papel de las E3-ubiquitin ligasas Bonus (Allton et al., 2009; Jain & Barton, 2010) y dSynoviolina (Yamasaki et al., 2007) en la estabilización de dP53. Conociendo el papel en mamíferos de RYBP sobre el control de los niveles de P53, junto con los resultados obtenidos en esta Tesis con dRYBP y la E3-ubiquitin ligasa Sce, podría resultar interesante estudiar la acción combinada de RNF2/RING1B (Sce en humanos) junto con RYBP en el control de la actividad apoptótica de las células de humano, quizá como un posible candidato terapéutico contra el cáncer.

¿Cuál es/son el/los mecanismos por los que Sce regula la apoptosis de una forma dependiente de Dp53? Conociendo la naturaleza de la proteína Sce como E3-ubiquitin ligasa y su función como regulador epigenético de la expresión génica, los resultados indican que Sce podría regularla de dos maneras posibles, no siendo excluyentes entre sí (Figura 57).

Por un lado, Sce podría estar ejerciendo su función a través de su papel como regulador epigenético y miembro del complejo PRC1 promoviendo la ubiquitinación de la histona H2A y así regulando epigenéticamente la transcripción de Dp53. De esta manera, al inactivar *Sce*, la transcripción de Dp53 dejaría de ser silenciada y, por tanto, sus niveles se encontrarían elevados en dichas condiciones. Por otro lado, Sce podría estar actuando como E3-ubiquitin ligasa, de forma independiente a su función epigenética en la transcripción, controlando la estabilización de los niveles de Dp53 mediante su ubiquitinación para la degradación vía proteasoma. Hasta ahora no se ha descrito la presencia de elementos de respuesta a Polycomb (PREs) en el gen de *Dp53*, de la misma manera que los experimentos de ChIP-Seq

demuestran que Sce no se une a las regiones genómicas de Dp53 en los discos imaginales de ala (Gutierrez et al., 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que RNF2, el homólogo de Sce en vertebrados (Fritsch et al., 2003; Gorfinkiel et al., 2004), actúa como una E3-ubiquitin ligasa que controla la estabilidad de P53 (Su et al., 2013; Wen et al., 2014). Los resultados de esta Tesis indican que Sce requiere a dRYBP para inhibir apoptosis y que la inactivación de Sce aumenta los niveles de Dp53, como se puede observar con la activación del reportero P53-RE-GFP. El hecho de que los altos niveles de Sce no produzca ningún efecto en el desarrollo (y por tanto tampoco produce ningún efecto en la transcripción génica), pero que a la vez sean capaces de reducir los niveles celulares de DP53 (Figura 49) apoya la hipótesis de que Sce actuaría estabilizando los niveles de DP53. También, el hecho de que la sobre-expresión de Sce sea capaz de reducir la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP mediante la disminución de los niveles celulares de DP53 (Figura 52) apoya, de nuevo, esta hipótesis. Resultaría interesante analizar los niveles de la proteína DP53 y comprobar si la sobre-expresión de Sce es capaz de disminuirlos mediante su ubiquitinación y degradación vía proteasoma.

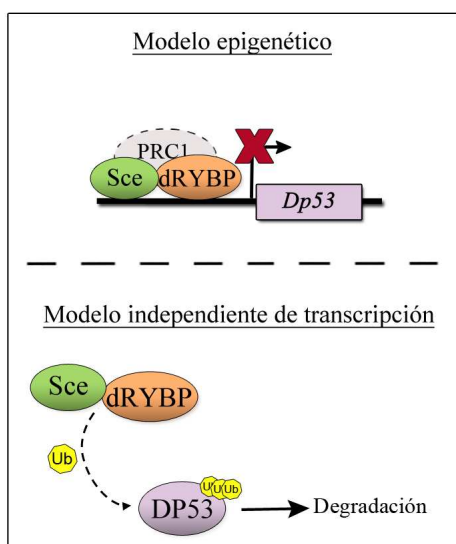


Figura 57: Mecanismo de acción de Sce en la regulación de la muerte celular dependiente de Dp53: modelo

En el panel superior se representa el modelo de actuación de Sce en la regulación de la transcripción a través de su papel en el complejo PRC1 y junto con dRYBP como ubiquitinador de la histona H2A para promover el silenciamiento génico de *Dp53*. En el panel inferior se presenta el modelo de actuación por el cual Sce mantendría los niveles de Dp53, de manera independiente a su papel en la regulación de la transcripción. Para ello, Sce junto dRYBP promoverían la poli-ubiquitinación de Dp53 para ser degradado vía proteasoma. Según los resultados de esta Tesis, ambos modelos podrían estar ocurriendo, sin ser excluyentes el uno del otro.

Los altos niveles de Sce inhibe la apoptosis asociada al crecimiento tumoral

La capacidad de los altos niveles de Sce para inhibir la apoptosis no solo se restringe a las situaciones de estrés inducidas por rayos-X y por altos niveles de DP53 (Figura 49, Figura 52 y Figura 53). También, los altos niveles de Sce son capaces de inhibir la apoptosis asociada a condiciones tumorales neoplásicas e hiperplásicas (Figura 54).

De manera interesante, los altos niveles de Sce no solo inhiben la apoptosis (Figura 54A-F) sino que también promueven crecimiento directa o indirectamente. La evidencia de esto está en el aumento de tamaño de los discos imaginales respecto de los discos control y, también, en el hecho de que no solo los fenotipos tumorales alivian, sino que las moscas presentan una menor letalidad (Figura 54G-N). Estos resultados parecen indicar que Sce podría tener un papel promoviendo la supervivencia celular o inhibiendo el crecimiento anormal de las células, de manera diferente a su papel anti-apoptótico. Resultados del laboratorio indican

que los sobre-crecimientos inducidos por la inactivación de *ph* o por los altos niveles de abrupt, no dependen directamente de los niveles de apoptosis, ya que se observa que tanto la sobre-expresión de DIAP1 como la inactivación de *Dp53*, no afectan el tamaño de los sobre-crecimientos ni la letalidad asociada a estos sobre-crecimientos (datos sin publicar).

Dado que en vertebrados se ha visto que RNF2 se encuentra elevado en muchos tumores (Sanchez-Beato et al., 2006) y debido a su papel controlando la expresión de P53, ha sido clasificado como un oncogén (Su et al., 2013; Wen et al., 2014). Dado que los resultados de esta Tesis indican que Sce también podría estar controlando los niveles de Dp53, quizá los datos estén apuntando hacia una posible conservación de los mecanismos de Sce a lo largo de la evolución que resultaría interesante de estudiar en vertebrados.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The expression of the microRNA *miR-7* is ubiquitously detected in wing imaginal disc cells, being the expression stronger in the “non-boundary cells” located at the Dorso-Ventral boundary of the disc.
2. The microRNA *miR-7* controls wing size and cell size most likely through the direct regulation of *dacapo* and *dRYBP* expression and probably through the indirect regulation of *cut*, *senseless* and the Notch pathway.
3. The microRNA *miR-306* controls wing size. Low levels of *miR-306* decrease the size of the wing and the size of its cells. High levels of *miR-306* induce cell death, which is dependent on *Dp53* levels, and also produce L5 wing vein shortening.
4. The microRNA *miR-306* controls the expression of *abrupt*, a BTB-ZF transcription factor, presumably by direct regulation. The 3'UTR of *abrupt* contains one binding site for *miR-306* that is responsive to high levels of *miR-306* and, also, the overexpression of *miR-306* in the wing imaginal disc cells represses *abrupt* expression in those cells.
5. The *abrupt* gene regulates the growth of the wing and the haltere by controlling cell size as well as cell cycle progression, having a bigger impact on the G1-S phase progression.
6. Neither *abrupt* overexpression nor *abrupt* inactivation in the haltere imaginal discs affect *Ultrabithorax* expression. However, *abrupt* and *Ultrabithorax* could still collaborate to promote haltere growth.
7. *abrupt* controls wing and haltere size by regulating *Cyclin D-Cdk4* and *Cyclin E-Cdk2* expression. High levels of these complexes and low levels of *dacapo*, rescue the wing size reduction caused by the inactivation of *abrupt*.
8. *dBre1* has an anti-apoptotic function which is dependent on *Dp53* and *dRYBP* levels. Inactivation of *dBre1* function induces cell death, which is increased when *Dp53* function is inactivated, and it is decreased when *dRYBP* levels are elevated.
9. *Sce* has an anti-apoptotic role dependent on *Dp53* levels. The inactivation of *Sce* function induces cell death, which is decreased when *Dp53* function is inactivated. Overexpression of *Sce* does not affect wing development. However, it inhibits the apoptosis induced by either high levels of *DP53* or high levels of *dRYBP*. It is proposed that *Sce* and *dRYBP* control cell death by epigenetic regulation of *Dp53* transcription and/or by the regulation of *DP53* protein levels independently of transcription leading to its proteasomal degradation.
10. High levels of *Sce* inhibit X-ray-induced-apoptosis and apoptosis associated with tumoral growth. It is proposed that high levels of *Sce* promote cell survival during tumoral development.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión del microRNA *miR-7* se detecta en todas las células del disco imaginal de ala, siendo su expresión más elevada en las “non-boundary cells” que componen el borde Dorso-Ventral del disco.
2. El microRNA *miR-7* controla el tamaño del ala y el tamaño de sus células mediante la regulación, probablemente directa, de *dacapo* y de *dRYBP*, así como mediante la regulación indirecta de *cut*, *senseless* y la vía de Notch.
3. El microRNA *miR-306* controla el crecimiento del ala. Bajos niveles de *miR-306* reducen el tamaño del ala y el tamaño de sus células. Altos niveles de *miR-306* inducen muerte celular dependiente de los niveles de *Dp53* y, además, acortan la longitud de la vena L5 en el ala.
4. El microRNA *miR-306* regula, probablemente de forma directa, la expresión de *abrupt* que codifica un factor de transcripción de la familia BTB-ZF. El 3'UTR de *abrupt* contiene un sitio de unión a *miR-306* que responde a altos niveles de *miR-306* y la sobre-expresión de *miR-306* reprime la expresión de *abrupt* en el disco imaginal de ala.
5. *abrupt* regula el crecimiento del ala y del halterio controlando el tamaño celular así como la progresión del ciclo celular, incidiendo principalmente en la progresión de la fase G1-S.
6. La sobre-expresión y la inactivación de *abrupt* no afecta la expresión de *Ultrabithorax* en el disco imaginal de halterio. Sin embargo, *abrupt* y *Ultrabithorax* podrían colaborar en el crecimiento del halterio.
7. *abrupt* controla el tamaño del ala y del halterio a través de la regulación de la expresión de *Ciclina D-Cdk4* y *Ciclina E-Cdk2*. Además, altos niveles de estos factores y bajos niveles de *dacapo* rescatan la disminución de tamaño del ala debida a la inactivación de *abrupt*.
8. *dBre1* tiene una función anti-apoptótica dependiente de los niveles de *Dp53* y de los niveles de *dRYBP*. La inactivación de la función de *dBre1* induce muerte celular que se incrementa cuando se inactiva la función de *Dp53*, y se disminuye al elevarse los niveles de *dRYBP*.
9. *Sce* tiene una función anti-apoptótica dependiente de los niveles de *Dp53*. La inactivación de la función de *Sce* induce muerte celular que disminuye cuando se inactiva la función de *Dp53*. La sobre-expresión de *Sce*, que no afecta al desarrollo del ala, inhibe la apoptosis inducida por altos niveles de *DP53* y por altos niveles de *dRYBP*. Se propone que *Sce* y *dRYBP* controlan la muerte celular mediante la regulación epigenética de la transcripción del gen *Dp53* y/o mediante la regulación, independiente de transcripción, de los niveles celulares de *Dp53* para su degradación vía proteosoma.

10. Los altos niveles de Sce inhiben la apoptosis inducida por rayos-X y la apoptosis asociada al crecimiento tumoral. Se propone que los altos niveles de Sce promueven la supervivencia celular en condiciones tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Aggarwal A, Hunter WJ, 3rd, Aggarwal H, Silva ED, Davey MS, Murphy RF, Agrawal DK (2010) Expression of leukemia/lymphoma-related factor (LRF/POKEMON) in human breast carcinoma and other cancers. *Exp Mol Pathol* 89: 140-8

Aggarwal H, Aggarwal A, Hunter WJ, 3rd, Yohannes P, Khan AU, Agrawal DK (2011) Expression of leukemia/lymphoma related factor (LRF/Pokemon) in human benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Exp Mol Pathol* 90: 226-30

Akam M, Averof M, Castelli-Gair J, Dawes R, Falciani F, Ferrier D (1994) The evolving role of Hox genes in arthropods. *Dev Suppl*: 209-15

Akimoto A, Wada H, Hayashi S (2005) Enhancer trapping with a red fluorescent protein reporter in *Drosophila*. *Dev Dyn* 233: 993-7

Allton K, Jain AK, Herz HM, Tsai WW, Jung SY, Qin J, Bergmann A, Johnson RL, Barton MC (2009) Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11612-6

Aparicio R, Neyen C, Lemaitre B, Busturia A (2013) dRYBP contributes to the negative regulation of the *Drosophila* Imd pathway. *PLoS One* 8: e62052

Aparicio R, Simoes Da Silva CJ, Busturia A (2015) MicroRNA miR-7 contributes to the control of *Drosophila* wing growth. *Dev Dyn* 244: 21-30

Ashburner M (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor,

B

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82

Baker NE (2007) Patterning signals and proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Curr Opin Genet Dev* 17: 287-93

Banisch TU, Goudarzi M, Raz E (2012) Small RNAs in germ cell development. *Curr Top Dev Biol* 99: 79-113

Bardin AJ, Perdigoto CN, Southall TD, Brand AH, Schweisguth F (2010) Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* 137: 705-14

Basso K, Dalla-Favera R (2012) Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* 247: 172-83

Becam I, Rafel N, Hong X, Cohen SM, Milan M (2011) Notch-mediated repression of bantam miRNA contributes to boundary formation in the *Drosophila* wing. *Development* 138: 3781-9

Beira JV, Paro R (2016) The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma* 125: 573-92

Bejarano F, Bortolamiol-Becet D, Dai Q, Sun K, Saj A, Chou YT, Raleigh DR, Kim K, Ni JQ, Duan H, Yang JS, Fulga TA, Van Vactor D, Perrimon N, Lai EC (2012) A genome-wide transgenic resource for conditional expression of *Drosophila* microRNAs. *Development* 139: 2821-31

- Bejarano F, Busturia A (2004) Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development. *Dev Biol* 268: 327-41
- Bejarano F, Gonzalez I, Vidal M, Busturia A (2005) The *Drosophila* RYBP gene functions as a Polycomb-dependent transcriptional repressor. *Mech Dev* 122: 1118-29
- Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, Hoskins RA, Spradling AC (2004) The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167: 761-81
- Bender W, Akam M, Karch F, Beachy PA, Peifer M, Spierer P, Lewis EB, Hogness DS (1983) Molecular Genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221: 23-9
- Biehls B, Sturtevant MA, Bier E (1998) Boundaries in the *Drosophila* wing imaginal disc organize vein-specific genetic programs. *Development* 125: 4245-57
- Blackman RK, Sanicola M, Raftery LA, Gillevet T, Gelbart WM (1991) An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development* 111: 657-66
- Blair SS, Brower DL, Thomas JB, Zavortink M (1994) The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 120: 1805-15
- Blochlinger K, Bodmer R, Jack J, Jan LY, Jan YN (1988) Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*. *Nature* 333: 629-35
- Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97: 865-75
- Bos R, van Diest PJ, van der Groep P, Greijer AE, Hermsen MA, Heijnen I, Meijer GA, Baak JP, Pinedo HM, van der Wall E, Shvarts A (2003) Protein expression of B-cell lymphoma gene 6 (BCL-6) in invasive breast cancer is associated with cyclin D1 and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Oncogene* 22: 8948-51
- Bosch TC, David CN (1984) Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol* 104: 161-71
- Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18: 5321-33
- Bourdon JC, Khoury MP, Diot A, Baker L, Fernandes K, Aoubala M, Quinlan P, Purdie CA, Jordan LB, Prats AC, Lane DP, Thompson AM (2011) p53 mutant breast cancer patients expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13: R7
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-15
- Bray S, Musisi H, Bienz M (2005) Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell* 8: 279-86

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113: 25-36

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3: e85

Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, Eberhart CG, Watkins DN (2008) Cooperation between the *Hic1* and *Ptch1* tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 22: 770-85

Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM (2000) *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101: 103-13

Brodsky MH, Weinert BT, Tsang G, Rong YS, McGinnis NM, Golic KG, Rio DC, Rubin GM (2004) *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* 24: 1219-31

Brower DL (1986) Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs. *Embo J* 5: 2649-56

Bryant PJ, Levinson P (1985) Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev Biol* 107: 355-63

Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205

Busturia A, Lloyd A, Bejarano F, Zavortink M, Xin H, Sakonju S (2001) The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the

maintenance of repression. *Development* 128: 2163-73

C

Cadigan KM (2002) Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* 13: 83-90

Calleja M, Moreno E, Pelaz S, Morata G (1996) Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274: 252-5

Cao R, Tsukada Y, Zhang Y (2005) Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular cell* 20: 845-54

Carleton M, Cleary MA, Linsley PS (2007) MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6: 2127-32

Casanova J, Sanchez-Herrero E, Morata G (1985) Contrabithorax and the control of spatial expression of the bithorax complex genes of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* 90: 179-96

Castelli-Gair J, Greig S, Micklem G, Akam M (1994) Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* 120: 1983-95

Caygill EE, Johnston LA (2008) Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and miR-125 heterochronic microRNAs. *Curr Biol* 18: 943-50

Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB (1989) The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* 3: 1424-36

Chen D, Zhang J, Li M, Rayburn ER, Wang H, Zhang R (2009) RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO Rep* 10: 166-72

Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, Karp

JE, Gokgoz N, Wunder JS, Andrulis IL, Levine AJ, Mankowski JL, Baylin SB (2004) Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6: 387-98

Chen WY, Zeng X, Carter MG, Morrell CN, Chiu Yen RW, Esteller M, Watkins DN, Herman JG, Mankowski JL, Baylin SB (2003) Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 33: 197-202

Chen YW, Song S, Weng R, Verma P, Kugler JM, Buescher M, Rouam S, Cohen SM (2014) Systematic study of *Drosophila* microRNA functions using a collection of targeted knockout mutations. *Dev Cell* 31: 784-800

Chevrier S, Corcoran LM (2014) BTB-ZF transcription factors, a growing family of regulators of early and late B-cell development. *Immunol Cell Biol* 92: 481-8

Chiang A, O'Connor MB, Paro R, Simon J, Bender W (1995) Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* 121: 1681-9

Classen AK, Bunker BD, Harvey KF, Vaccari T, Bilder D (2009) A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nat Genet* 41: 1150-5

Coelho CM, Leivers SJ (2000) Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 2927-34

Cole ES, Palka J (1982) The pattern of campaniform sensilla on the wing and haltere of *Drosophila melanogaster* and several of its homeotic mutants. *J Embryol Exp Morphol* 71: 41-61

Conlon I, Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* 96: 235-44

Cook O, Biehs B, Bier E (2004) brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* 131: 2113-24

Crickmore MA, Ranade V, Mann RS (2009) Regulation of Ubx expression by epigenetic enhancer silencing in response to Ubx levels and genetic variation. *PLoS Genet* 5: e1000633

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-96

D

Da Ros VG, Gutierrez-Perez I, Ferres-Marco D, Dominguez M (2013) Dampening the signals transduced through hedgehog via microRNA miR-7 facilitates notch-induced tumorigenesis. *PLoS Biol* 11: e1001554

Danen-van Oorschot AA, Voskamp P, Seelen MC, van Miltenburg MH, Bolk MW, Tait SW, Boesen-de Cock JG, Rohn JL, Borst J, Noteborn MH (2004) Human death effector domain-associated factor interacts with the viral apoptosis agonist Apoptin and exerts tumor-preferential cell killing. *Cell Death Differ* 11: 564-73

Datar SA, Jacobs HW, de la Cruz AF, Lehner CF, Edgar BA (2000) The *Drosophila* cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *Embo J* 19: 4543-54

Davies JM, Hawe N, Kabarowski J, Huang QH, Zhu J, Brand NJ, Leprince D, Dhordain P, Cook M, Morriss-Kay G,

Zelent A (1999) Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene. *Oncogene* 18: 365-75

de Celis JF (1998) Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing. *Int J Dev Biol* 42: 335-43

de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ (1996) Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122: 359-69

de Navas LF, Garaulet DL, Sanchez-Herrero E (2006) The ultrabithorax Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development* 133: 4495-506

de Nooij JC, Letendre MA, Hariharan IK (1996) A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 87: 1237-47

Dekanty A, Milan M (2011) The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO Rep* 12: 1003-10

DeLorenzi M, Ali N, Saari G, Henry C, Wilcox M, Bienz M (1988) Evidence that the Abdominal-B element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. *Embo J* 7: 3223-31

Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM (1993) Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75: 741-52

Dichtel-Danjoy ML, Ma D, Dourlen P, Chatelain G, Napoletano F, Robin M, Corbet M, Levet C, Hafsi H, Hainaut P, Ryoo HD, Bourdon JC, Mollereau B (2013) *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced

proliferation. *Cell Death Differ* 20: 108-16

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblaue S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448: 151-6

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-21

Doumpas N, Ruiz-Romero M, Blanco E, Edgar B, Corominas M, Teleman AA (2013) Brk regulates wing disc growth in part via repression of Myc expression. *EMBO Rep* 14: 261-8

Duman-Scheel M, Johnston LA, Du W (2004) Repression of dMyc expression by Wingless promotes Rbf-induced G1 arrest in the presumptive *Drosophila* wing margin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3857-62

Duncan I (1987) The bithorax complex. *Annu Rev Genet* 21: 285-319

E

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4: 721-6

Edgar BA, O'Farrell PH (1989) Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* 57: 177-87

Edgar BA, O'Farrell PH (1990) The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* 62: 469-80

Eun SH, Stoiber PM, Wright HJ, McMurdie KE, Choi CH, Gan Q, Lim C, Chen X (2013) MicroRNAs

downregulate Bag of marbles to ensure proper terminal differentiation in the *Drosophila* male germline. *Development* 140: 23-30

F

Faucheux M, Roignant JY, Netter S, Charollais J, Antoniewski C, Theodore L (2003) batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* 23: 1181-95

Fereres S, Simon R, Busturia A (2013) A novel dRYBP-SCF complex functions to inhibit apoptosis in *Drosophila*. *Apoptosis* 18: 1500-12

Fereres S, Simon R, Mohd-Sarip A, Verrijzer CP, Busturia A (2014) dRYBP counteracts chromatin-dependent activation and repression of transcription. *PLoS One* 9: e113255

Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ, Dominguez M (2006) Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 439: 430-6

Franke A, DeCamillis M, Zink D, Cheng N, Brock HW, Paro R (1992) Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 11: 2941-50

Fristrom D, Gotwals P, Eaton S, Kornberg TB, Sturtevant M, Bier E, Fristrom JW (1994) Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development* 120: 2661-71

Fristrom D, Wilcox M, Fristrom J (1993) The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development* 117: 509-23

Fritsch C, Beuchle D, Muller J (2003) Molecular and genetic analysis of the Polycomb group gene Sex combs extra/Ring in *Drosophila*. *Mech Dev* 120: 949-54

Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147: 742-58

G

Gallant P (2013) Myc function in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a014324

Ge X, Zhang Y, Jiang J, Zhong Y, Yang X, Li Z, Huang Y, Tan A (2013) Identification of microRNAs in *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* based on deep sequencing and homology analysis. *Int J Biol Sci* 9: 1-15

Gilbert S (2000) *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA

Glubb DM, Innocenti F (2011) Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3: 299-313

Gonzalez I, Aparicio R, Busturia A (2008) Functional characterization of the dRYBP gene in *Drosophila*. *Genetics* 179: 1373-88

Gonzalez I, Busturia A (2009) High levels of dRYBP induce apoptosis in *Drosophila* imaginal cells through the activation of reaper and the requirement of trithorax, dredd and dFADD. *Cell Res* 19: 747-57

Gonzalez-Gaitan MA, Micol JL, Garcia-Bellido A (1990) Developmental genetic analysis of Contrabithorax mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126: 139-55

Gorfinkiel N, Fanti L, Melgar T, Garcia E, Pimpinelli S, Guerrero I, Vidal

M (2004) The *Drosophila* Polycomb group gene *Sex combs extra* encodes the ortholog of mammalian Ring1 proteins. *Mech Dev* 121: 449-62

Grana X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211-9

Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458: 1127-30

Grieder NC, Charlafti I, Kloter U, Jackle H, Schafer U, Gehring WJ (2007) Misexpression screen in *Drosophila melanogaster* aiming to reveal novel factors involved in formation of body parts. *Genetics* 175: 1707-18

Guicciardi ME, Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J* 23: 1625-37

Gutierrez L, Oktaba K, Scheuermann JC, Gambetta MC, Ly-Hartig N, Muller J (2012) The role of the histone H2A ubiquitinase *Sce* in Polycomb repression. *Development* 139: 117-27

H

Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16: 2179-206

Harrison RG (1924) Some Unexpected Results of the Heteroplastic Transplantation of Limbs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10: 69-74

Harrison SD, Travers AA (1990) The *tramtrack* gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. *Embo J* 9: 207-16

Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW,

Ruohola-Baker H (2005) Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435: 974-8

Hattori Y, Usui T, Satoh D, Moriyama S, Shimono K, Itoh T, Shirahige K, Uemura T (2013) Sensory-neuron subtype-specific transcriptional programs controlling dendrite morphogenesis: genome-wide analysis of *Abrupt* and *Knot/Collier*. *Dev Cell* 27: 530-44

Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM (1995) *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83: 1253-62

Haynie JL, Bryant PJ (1977) The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* 183: 85-100

Hazlerigg T, Watkins WS, Marcey D, Tu C, Karow M, Lin XR (1990) The *exuperantia* gene is required for *Drosophila* spermatogenesis as well as anteroposterior polarity of the developing oocyte, and encodes overlapping sex-specific transcripts. *Genetics* 126: 607-17

Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2229-34

Henriksson M, Luscher B (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68: 109-82

Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and

deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17: 2648-63

Hernandez-Martinez R, Covarrubias L (2011) Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ* 53: 245-58

Herranz H, Hong X, Perez L, Ferreira A, Olivieri D, Cohen SM, Milan M (2010) The miRNA machinery targets Mei-P26 and regulates Myc protein levels in the *Drosophila* wing. *Embo J* 29: 1688-98

Herranz H, Milan M (2008) Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in *Drosophila*. *Cell Cycle* 7: 3335-7

Herranz H, Perez L, Martin FA, Milan M (2008) A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing. *Embo J* 27: 1633-45

Hidalgo A (1994) Three distinct roles for the engrailed gene in *Drosophila* wing development. *Curr Biol* 4: 1087-98

Hideshima T, Mitsiades C, Ikeda H, Chauhan D, Raje N, Gorgun G, Hideshima H, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco DR, Anderson KC (2010) A proto-oncogene BCL6 is up-regulated in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma cells. *Blood* 115: 3772-5

Hietakangas V, Cohen SM (2009) Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43: 389-410

Hirata Y, Ogasawara N, Sasaki M, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Wada T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T (2009) BCL6 degradation caused by the interaction with the C-terminus of pro-HB-EGF induces cyclin D2

expression in gastric cancers. *Br J Cancer* 100: 1320-9

Hofstetter G, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zoric A, Holzer B, Schuster E, Mobus VJ, Reimer D, Daxenbichler G, Marth C, Zeimet AG, Concin N, Zeillinger R (2010)

) Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer. *Oncogene* 29: 1997-2004

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53

Horsham JL, Ganda C, Kalinowski FC, Brown RA, Epis MR, Leedman PJ (2015) MicroRNA-7: A miRNA with expanding roles in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 69: 215-24

Hu S, Fambrough D, Atashi JR, Goodman CS, Crews ST (1995) The *Drosophila* abrupt gene encodes a BTB-zinc finger regulatory protein that controls the specificity of neuromuscular connections. *Genes Dev* 9: 2936-48

Huang YC, Smith L, Poulton J, Deng WM (2013) The microRNA miR-7 regulates Tramtrack69 in a developmental switch in *Drosophila* follicle cells. *Development* 140: 897-905

Hurtz C, Hatzi K, Cerchietti L, Braig M, Park E, Kim YM, Herzog S, Ramezani-Rad P, Jumaa H, Muller MC, Hofmann WK, Hochhaus A, Ye BH, Agarwal A, Druker BJ, Shah NP, Melnick AM, Muschen M (2011) BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 208: 2163-74

Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD

(2003) A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular cell* 11: 261-6

I

Inui M, Martello G, Piccolo S (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 252-63

J

Jack J, Dorsett D, Delotto Y, Liu S (1991) Expression of the cut locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer. *Development* 113: 735-47

Jackle H, Hoch M, Pankratz MJ, Gerwin N, Sauer F, Bronner G (1992) Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J Cell Sci Suppl* 16: 39-51

Jafar-Nejad H, Tien AC, Acar M, Bellen HJ (2006) Senseless and Daughterless confer neuronal identity to epithelial cells in the *Drosophila* wing margin. *Development* 133: 1683-92

Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R (2010) Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* 11: 52

Jain AK, Barton MC (2010) Making sense of ubiquitin ligases that regulate p53. *Cancer Biol Ther* 10: 665-72

Jang AC, Chang YC, Bai J, Montell D (2009) Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. *Nat Cell Biol* 11: 569-79

Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Nordsell R, Shames DS, Minna JD, Corey DR (2006) Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* 13: 787-92

Jin S, Martinek S, Joo WS, Wortman JR, Mirkovic N, Sali A, Yandell MD, Pavletich NP, Young MW, Levine AJ (2000) Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7301-6

Johnson SA, Milner MJ (1987) The final stages of wing development in *Drosophila melanogaster*. *Tissue Cell* 19: 505-13

Johnson TK, Judd BH (1979) Analysis of the Cut Locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 92: 485-502

Johnston LA, Edgar BA (1998) Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 394: 82-4

Johnston LA, Gallant P (2002) Control of growth and organ size in *Drosophila*. *Bioessays* 24: 54-64

Johnston LA, Prober DA, Edgar BA, Eisenman RN, Gallant P (1999) *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* 98: 779-90

Jones L, Richardson H, Saint R (2000) Tissue-specific regulation of cyclin E transcription during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Development* 127: 4619-30

Jürgens G (1985) A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 316: 153-155.

Justice NJ, Jan YN (2002) Variations on the Notch pathway in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 12: 64-70

K

Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Verstreken P, Hiesinger PR, Bellen HJ, Halder G (2002) Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* 129: 5719-30

Karch F, Bender W, Weiffenbach B (1990) abdA expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 4: 1573-87

Kauffman SA (1981) Patterns of temperature sensitivity in Contrabithorax/Ultrabithorax heterozygotes of *Drosophila*. *Dev Biol* 88: 341-51

Kennison JA, Tamkun JW (1988) Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8136-40

Kidd S, Lockett TJ, Young MW (1983) The Notch locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 34: 421-33

Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13: 793-7

Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF (1994) Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77: 107-20

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294: 173-7

Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS (1989) Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by

alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev* 3: 243-58

Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78: 191-201

Kruse JP, Gu W (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609-22

L

Lagarou A, Mohd-Sarip A, Moshkin YM, Chalkley GE, Bezstarosti K, Demmers JA, Verrijzer CP (2008) dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev* 22: 2799-810

Lai EC, Tam B, Rubin GM (2005) Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 19: 1067-80

Lane DP, Verma C (2012) Mdm2 in evolution. *Genes Cancer* 3: 320-4

Lane ME, Sauer K, Wallace K, Jan YN, Lehner CF, Vaessin H (1996) Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87: 1225-35

Langlais KK, Brown JL, Kassis JA (2012) Polycomb group proteins bind an engrailed PRE in both the "ON" and "OFF" transcriptional states of engrailed. *PLoS One* 7: e48765

Lawrence P (1992) The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design.

Lecona E, Rojas LA, Bonasio R, Johnston A, Fernandez-Capetillo O, Reinberg D (2013) Polycomb protein SCML2 regulates the cell cycle by binding and modulating CDK/CYCLIN/p21 complexes. *PLoS Biol* 11: e1001737

Lee LA, Orr-Weaver TL (2003) Regulation of cell cycles in *Drosophila*

development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* 37: 545-78

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-54

Lehner CF, O'Farrell PH (1990a) *Drosophila cdc2* homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant. *Embo J* 9: 3573-81

Lehner CF, O'Farrell PH (1990b) The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* 61: 535-47

Lewis EB (1955) Some aspects of position pseudoallelism. *American Naturalist* 89: 73-89

Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-70

Li W, Wang F, Menut L, Gao FB (2004) BTB/POZ-zinc finger protein abruptly suppresses dendritic branching in a neuronal subtype-specific and dosage-dependent manner. *Neuron* 43: 823-34

Li X, Carthew RW (2005) A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123: 1267-77

Li X, Cassidy JJ, Reinke CA, Fischboeck S, Carthew RW (2009) A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* 137: 273-82

Love IM, Grossman SR (2012) It Takes 15 to Tango: Making Sense of the Many Ubiquitin Ligases of p53. *Genes Cancer* 3: 249-63

Loya CM, Lu CS, Van Vactor D, Fulga TA (2009) Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms. *Nat Methods* 6: 897-903

Lucas K, Raikhel AS (2013) Insect microRNAs: biogenesis, expression

profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol* 43: 24-38

M

Macedo LM, Nunes FM, Freitas FC, Pires CV, Tanaka ED, Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simoes ZL (2016) MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol Biol* 25: 216-26

MacKenzie SH, Clark AC (2012) Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol* 747: 55-73

Madhavan MM, Madhavan K (1980) Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* 60: 1-31

Maeda T (2016) Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors. *Int J Hematol* 104: 310-23

Manjon C, Sanchez-Herrero E, Suzanne M (2007) Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 57-63

Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, Olivier M, Hall J, Mollereau B, Hainaut P, Bourdon JC (2011) Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ* 18: 1815-24

Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, Martel-Planche G, Ashton-Prolla P, Olivier M, Brentani RR, Hainaut P, Achatz MI (2009) TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* 46: 766-72

Martinez AM, Cavalli G (2006) The role of polycomb group proteins in

cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 5: 1189-97

Martinez AM, Schuettengruber B, Sakr S, Janic A, Gonzalez C, Cavalli G (2009) Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat Genet* 41: 1076-82

Martinez-Arias A, Lawrence PA (1985) Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* 313: 639-42

Melo J, Toczyski D (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14: 237-45

Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER (1981) Dwarfism in the pygmy. An isolated deficiency of insulin-like growth factor I. *N Engl J Med* 305: 965-8

Meyer CA, Jacobs HW, Datar SA, Du W, Edgar BA, Lehner CF (2000) *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *Embo J* 19: 4533-42

Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS (1997) The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124: 1485-95

Milan M, Weihe U, Tiong S, Bender W, Cohen SM (2001) msh specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* 128: 3263-8

Mishra RK, Mihaly J, Barges S, Spierer A, Karch F, Hagstrom K, Schweinsberg SE, Schedl P (2001) The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* 21: 1311-8

Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK (2001)

Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 413: 311-6

Moberg KH, Mukherjee A, Veraksa A, Artavanis-Tsakonas S, Hariharan IK (2004) The *Drosophila* F box protein archipelago regulates dMyc protein levels in vivo. *Curr Biol* 14: 965-74

Mohammad HP, Zhang W, Prevas HS, Leadem BR, Zhang M, Herman JG, Hooker CM, Watkins DN, Karim B, Huso DL, Baylin SB (2011) Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Delta716) mice. *Oncogene* 30: 2659-69

Mohd-Sarip A, Lagarou A, Doyen CM, van der Knaap JA, Aslan U, Bezstarosti K, Yassin Y, Brock HW, Demmers JA, Verrijzer CP (2012) Transcription-independent function of Polycomb group protein PSC in cell cycle control. *Science* 336: 744-7

Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G (1999) *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285: 2126-9

Moreno E, Morata G (1999) Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* 400: 873-7

Morgan TH, Bridges CB, Sturtevant AH (1925) The genetics of *Drosophila melanogaster*.

Muller J, Verrijzer P (2009) Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* 19: 150-8

N

Nakanishi S, Lee JS, Gardner KE, Gardner JM, Takahashi YH, Chandrasekharan MB, Sun ZW, Osley MA, Strahl BD, Jaspersen SL, Shilatifard

A (2009) Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *J Cell Biol* 186: 371-7

Needhamsen M, White RB, Giles KM, Dunlop SA, Thomas MG (2014) Regulation of Human PAX6 Expression by miR-7. *Evol Bioinform Online* 10: 107-13

Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA (1998) Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93: 1183-93

Neumann CJ, Cohen SM (1996) A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 122: 3477-85

Neumann CJ, Cohen SM (1997) Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124: 871-80

Nolo R, Abbott LA, Bellen HJ (2000) Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102: 349-62

O

O'Brochta DA, Bryant PJ (1985) A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in *Drosophila*. *Nature* 313: 138-41

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 15: 354-63

Oktaba K, Gutierrez L, Gagneur J, Girardot C, Sengupta AK, Furlong EE, Muller J (2008) Dynamic regulation by

polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev Cell* 15: 877-89

P

Pandey UB, Nichols CD (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 63: 411-36

Parisi F, Riccardo S, Daniel M, Saqcena M, Kundu N, Pession A, Grifoni D, Stocker H, Tabak E, Bellosa P (2011) *Drosophila* insulin and target of rapamycin (TOR) pathways regulate GSK3 beta activity to control Myc stability and determine Myc expression in vivo. *BMC Biol* 9: 65

Parker J (2011) Morphogens, nutrients, and the basis of organ scaling. *Evol Dev* 13: 304-14

Pavlopoulos A, Akam M (2011) Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2855-60

Pek JW, Lim AK, Kai T (2009) *Drosophila* maelstrom ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7. *Dev Cell* 17: 417-24

Perez-Roger I, Solomon DL, Sewing A, Land H (1997) Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14: 2373-81

Pietersen AM, van Lohuizen M (2008) Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* 20: 201-7

Posakony LG, Raftery LA, Gelbart WM (1990) Wing formation in

Drosophila melanogaster requires decapentaplegic gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech Dev* 33: 69-82

Pringle JWS (1948) The Gyroscopic Mechanism of the Halteres of Diptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 233: 347-384

Prober DA, Edgar BA (2000) Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* 100: 435-46

Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 192-206

Q

Qu H, Qu D, Chen F, Zhang Z, Liu B, Liu H (2010) ZBTB7 overexpression contributes to malignancy in breast cancer. *Cancer Invest* 28: 672-8

R

Rafel N, Milan M (2008) Notch signalling coordinates tissue growth and wing fate specification in *Drosophila*. *Development* 135: 3995-4001

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R (2008) MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 68: 8195-200

Remillieux-Leschelle N, Santamaria P, Randsholt NB (2002) Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics* 162: 1259-74

Richardson H, O'Keefe LV, Marty T, Saint R (1995) Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern

formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Development* 121: 3371-9

Robertson FW (1959) Studies in Quantitative Inheritance. Xii. Cell Size and Number in Relation to Genetic and Environmental Variation of Body Size in *Drosophila*. *Genetics* 44: 869-96

Roch F, Akam M (2000) Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* 127: 97-107

Roch F, Baonza A, Martin-Blanco E, Garcia-Bellido A (1998) Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* 125: 1823-32

Ronshaugen M, Biemar F, Piel J, Levine M, Lai EC (2005) The *Drosophila* microRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev* 19: 2947-52

Rubin GM, Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218: 348-53

S

Sambrook J, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Sanchez-Beato M, Sanchez E, Gonzalez-Carrero J, Morente M, Diez A, Sanchez-Verde L, Martin MC, Cigudosa JC, Vidal M, Piris MA (2006) Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* 19: 684-94

Sanchez-Herrero E, Vernos I, Marco R, Morata G (1985) Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* 313: 108-13

- Sanicola M, Sekelsky J, Elson S, Gelbart WM (1995) Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* 139: 745-56
- Sarov M, Barz C, Jambor H, Hein MY, Schmied C, Suchold D, Stender B, Janosch S, K JV, Krishnan RT, Krishnamoorthy A, Ferreira IR, Ejsmont RK, Finkl K, Hasse S, Kampf P, Plewka N, Vinis E, Schloissnig S, Knust E et al. (2016) A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *Elife* 5: e12068
- Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K (2011) MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 278: 1598-609
- Shlevkov E, Morata G (2012) A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 19: 451-60
- Siggs OM, Beutler B (2012) The BTB-ZF transcription factors. *Cell Cycle* 11: 3358-69
- Simon J, Chiang A, Bender W, Shimell MJ, O'Connor M (1993) Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol* 158: 131-44
- Simon R, Aparicio R, Housden BE, Bray S, Busturia A (2014) *Drosophila* p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. *Apoptosis* 19: 1430-43
- Smith-Bolton RK, Worley MI, Kanda H, Hariharan IK (2009) Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev Cell* 16: 797-809
- Smolik-Utlaut SM (1990) Dosage requirements of Ultrabithorax and bithoraxoid in the determination of segment identity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 124: 357-66
- St Johnston D (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3: 176-88
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* 1: E60
- Stewart CE, Rotwein P (1996) Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76: 1005-26
- Strigini M, Cohen SM (1997) A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing. *Development* 124: 4697-705
- Strigini M, Cohen SM (1999) Formation of morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* 10: 335-44
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413: 316-22
- Sturtevant MA, Biehs B, Marin E, Bier E (1997) The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* 124: 21-32
- Sturtevant MA, Bier E (1995) Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development* 121: 785-801
- Sturtevant MA, Roark M, Bier E (1993) The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev* 7: 961-73
- Su WJ, Fang JS, Cheng F, Liu C, Zhou F, Zhang J (2013) RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote

tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1720-5

Sugimura K, Satoh D, Estes P, Crews S, Uemura T (2004) Development of morphological diversity of dendrites in *Drosophila* by the BTB-zinc finger protein abrupt. *Neuron* 43: 809-22

Suzanne M, Steller H (2013) Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ* 20: 669-75

Swanhart LM, Sanders AN, Duronio RJ (2007) Normal regulation of Rbf1/E2f1 target genes in *Drosophila* type 1 protein phosphatase mutants. *Dev Dyn* 236: 2567-77

T

Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber D, Hariharan IK (2002) salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110: 467-78

Thompson BJ (2010) Developmental control of cell growth and division in *Drosophila*. *Curr Opin Cell Biol* 22: 788-94

Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A (1999) Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* 19: 5189-202

Tiong S, Bone LM, Whittle JR (1985) Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* 200: 335-42

Tokusumi T, Tokusumi Y, Hopkins DW, Shoue DA, Corona L, Schulz RA (2011) Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during

Drosophila hematopoiesis. *Development* 138: 3879-84

Turkel N, Sahota VK, Bolden JE, Goulding KR, Doggett K, Willoughby LF, Blanco E, Martin-Blanco E, Corominas M, Ellul J, Aigaki T, Richardson HE, Brumby AM (2013) The BTB-zinc finger transcription factor abrupt acts as an epithelial oncogene in *Drosophila melanogaster* through maintaining a progenitor-like cell state. *PLoS Genet* 9: e1003627

V

Vactor DV, Sink H, Fambrough D, Tsou R, Goodman CS (1993) Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* 73: 1137-53

Vidal M, Cagan RL (2006) *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev* 16: 10-6

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 275-83

W

Wagner SD, Ahearne M, Ko Ferrigno P (2011) The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol* 152: 3-12

Waldron JA, Newbury SF (2012) The roles of miRNAs in wing imaginal disc development in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans* 40: 891-5

Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB (1995) p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1: 570-7

Walker SR, Liu S, Xiang M, Nicolais M, Hatzi K, Giannopoulou E, Elemento O, Cerchietti L, Melnick A, Frank DA (2015) The transcriptional

modulator BCL6 as a molecular target for breast cancer therapy. *Oncogene* 34: 1073-82

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431: 873-8

Weatherbee SD, Halder G, Kim J, Hudson A, Carroll S (1998) Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev* 12: 1474-82

Weigmann K, Cohen SM, Lehner CF (1997) Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* 124: 3555-63

Weinkove D, Leever SJ (2000) The genetic control of organ growth: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 10: 75-80

Welcker M, Clurman BE (2008) FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 8: 83-93

Welcker M, Orian A, Grim JE, Eisenman RN, Clurman BE (2004) A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol* 14: 1852-7

Wen W, Peng C, Kim MO, Ho Jeong C, Zhu F, Yao K, Zykova T, Ma W, Carper A, Langfald A, Bode AM, Dong Z (2014) Knockdown of RNF2 induces apoptosis by regulating MDM2 and p53 stability. *Oncogene* 33: 421-8

White RAH, Akam ME (1985) Contrabithorax mutations cause inappropriate expression of Ultrabithorax products in *Drosophila*. *Nature* 318: 567-569

Wiese KE, Walz S, von Eyss B, Wolf E, Athineos D, Sansom O, Eilers M (2013) The role of MIZ-1 in MYC-dependent tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a014290

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-34

Wylie A, Lu WJ, D'Brot A, Buszczak M, Abrams JM (2014) p53 activity is selectively licensed in the *Drosophila* stem cell compartment. *Elife* 3: e01530

X

Xu D, Woodfield SE, Lee TV, Fan Y, Antonio C, Bergmann A (2009) Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 3: 78-90

Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H, Cato L, Thornton JE, Gregory RI, Morrissey C, Vessella RL, Montironi R, Magi-Galluzzi C, Kantoff PW, Balk SP et al. (2012) EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* 338: 1465-9

Y

Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, Maruyama I et al. (2007) Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *Embo J* 26: 113-22

Yamauchi S, Hou YY, Guo AK, Hirata H, Nakajima W, Yip AK, Yu CH, Harada I, Chiam KH, Sawada Y, Tanaka N, Kawauchi K (2014) p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion. *J Cell Biol* 204: 1191-207

Ylla G, Fromm B, Piulachs MD, Belles X (2016) The microRNA toolkit of insects. *Sci Rep* 6: 37736

Yu JY, Reynolds SH, Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Ward EJ, Long D, Ding Y, Ruohola-Baker H (2009) Dicer-1-dependent Dacapo suppression acts downstream of Insulin receptor in regulating cell division of *Drosophila* germline stem cells. *Development* 136: 1497-507

Z

Zavortink M, Sakonju S (1989) The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev* 3: 1969-81

Zecca M, Basler K, Struhl G (1996) Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* 87: 833-44

Zhang YQ, Xiao CX, Lin BY, Shi Y, Liu YP, Liu JJ, Guleng B, Ren JL (2013) Silencing of Pokemon enhances caspase-dependent apoptosis via fas- and mitochondria-mediated pathways in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 8: e68981

Zielke N, Korzeliuss J, van Straaten M, Bender K, Schuhknecht GF, Dutta D, Xiang J, Edgar BA (2014) Fly-FUCCI: A versatile tool for studying cell proliferation in complex tissues. *Cell Rep* 7: 588-98

ANEXO 1

ANEXO 1

APÉNDICE 1

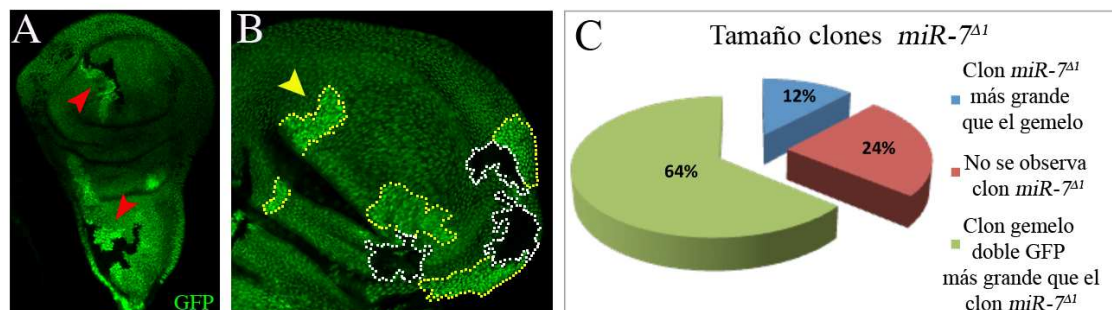


Figura A1. 1: Análisis de los clones deficientes para *miR-7* en los discos imaginales de ala.

A) Disco imaginal de ala, mostrando los grupos de clones (cabezas de flecha roja) deficientes para *miR-7* (clones con ausencia de GFP) y sus clones gemelos con niveles normales de *miR-7* (expresión doble de GFP). Los clones fueron inducidos en larvas de 24-48h. **B)** Ampliación de disco de ala en el que se muestran varios pares de clones: los clones deficientes para *miR-7* (marcados por la ausencia de GFP y delimitados en blanco) y los clones salvajes para *miR-7* (marcados con dos dosis de GFP y delimitados en amarillo). Nótese como la cabeza de flecha amarilla marca un clon salvaje para *miR-7* que no presenta un clon deficiente para *miR-7* gemelo, indicando que probablemente haya sido eliminado. **C)** Gráfica circular mostrando los porcentajes de cada tipo de clon (n=25 clones).

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

APÉNDICE 2

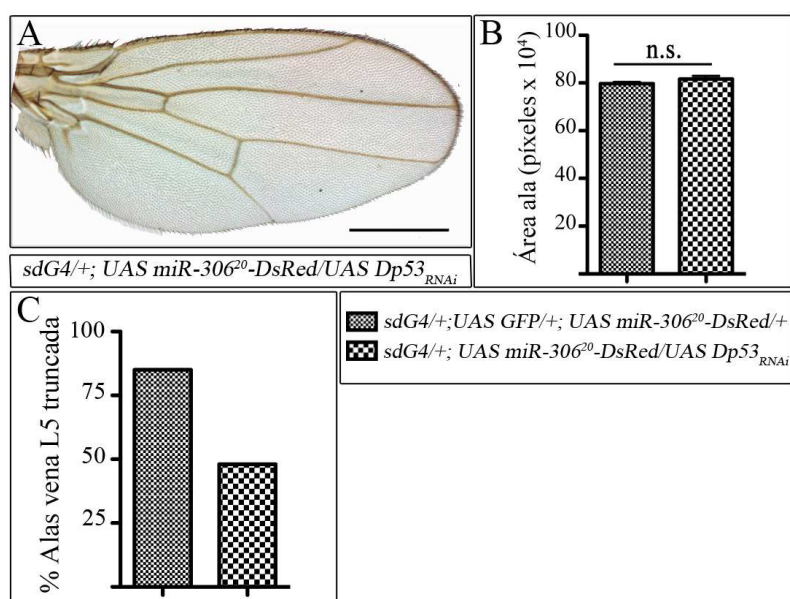


Figura A2. 1: Efecto de la inactivación de la función de *Dp53* en los fenotipos asociados a la sobre-expresión de *miR-306*.

A) Ala *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53_{RNAi}*. El fenotipo de las alas *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed* se muestra en la Figura 25E, página 57. **B)** Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas *sdG4; UAS GFP/+; UAS miR-306²⁰-DsRed /+* versus *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53_{RNAi}* (n=20 alas para cada genotipo). **C)** Gráfica representando el porcentaje de alas que tienen la vena L5 truncada en *sdG4; UAS GFP/+; UAS miR-306²⁰-DsRed /+* versus *sdG4/+; UAS miR-306²⁰-DsRed/UAS Dp53_{RNAi}* (n=20 alas para cada genotipo). Las barra de calibración representa 500 μ m para el ala. n.s.: no significativo.

APÉNDICE 3

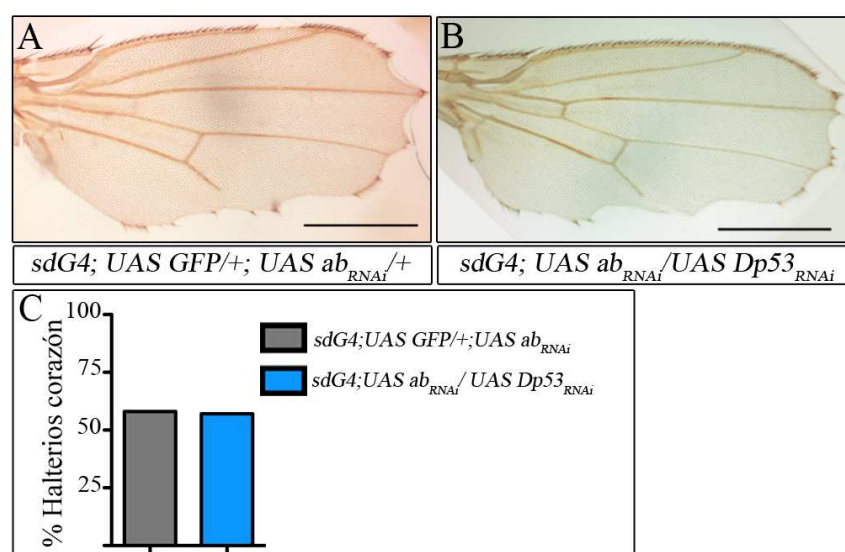


Figura A3. 1: Efecto de la inactivación de la función de *Dp53* en los fenotipos de ala y halterio asociados a la inactivación de *abrupt*.

A) Ala *sdG4; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+*. **B)** Ala *sdG4; UAS ab_{RNAi}/UAS Dp53_{RNAi}*. Obsérvese como ni en (A) ni en (B) la vena L5 se completa. Nótese también que en (A) y (B) los “notchings” que presentan las alas es debido al fenotipo que presenta *scalloped* en homocigosis. **C)** Gráfica representando el porcentaje de los halterios corazón de las moscas *sdG4; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* versus *sdG4; UAS ab_{RNAi}/UAS Dp53_{RNAi}* (n=90 y n=84 alas respectivamente).

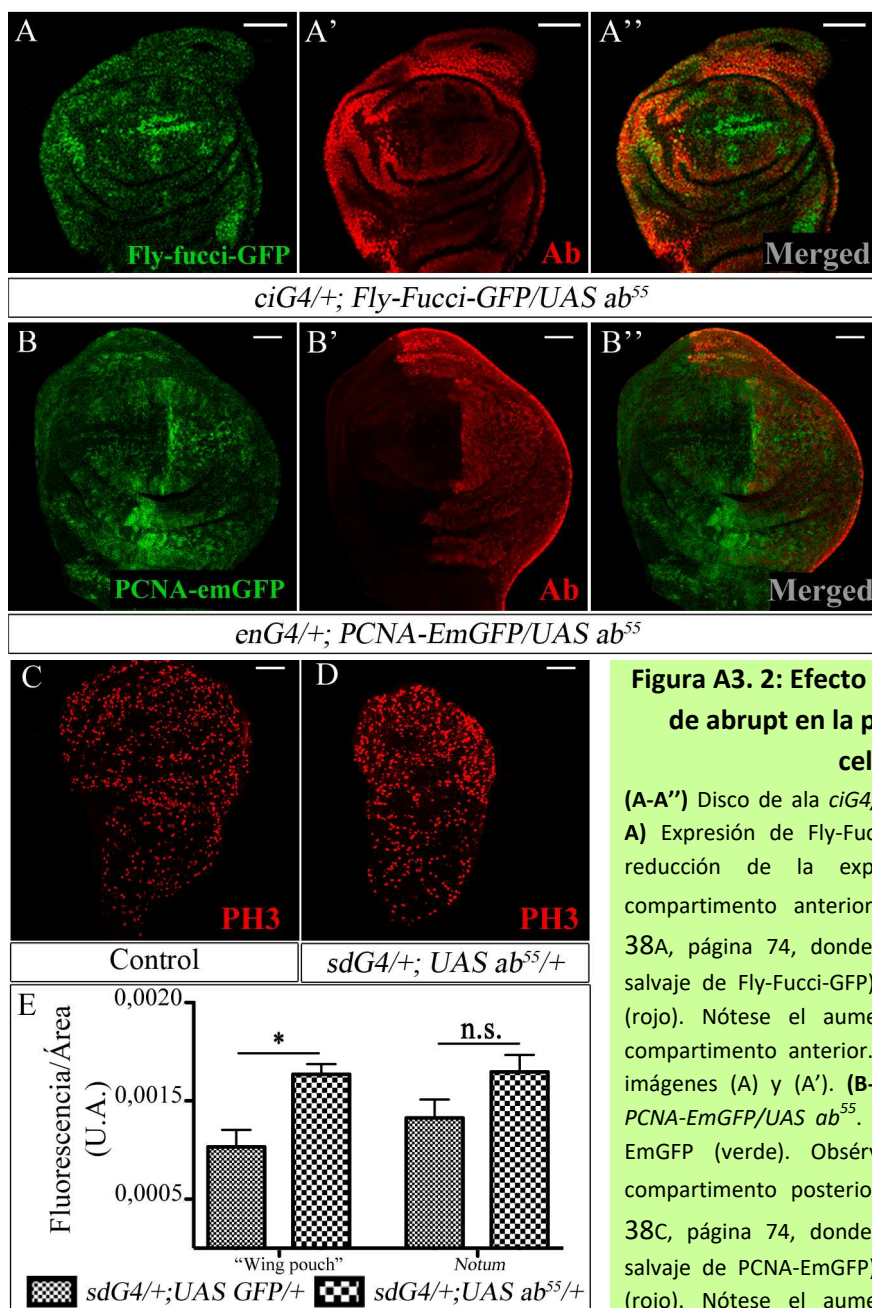


Figura A3. 2: Efecto de la sobre-expresión de abrupt en la progresión del ciclo celular.

(A-A'') Disco de ala *ciG4/+; Fly-Fucci-GFP/UAS ab⁵⁵*. **A)** Expresión de Fly-Fucci-GFP (verde). Nótese la reducción de la expresión de GFP en el compartimento anterior. (Comparar con Figura 38A, página 74, donde se muestra la expresión salvaje de Fly-Fucci-GFP). **A')** Expresión de Abrupt (rojo). Nótese el aumento de expresión en el compartimento anterior. **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). **(B-B'')** Disco de ala *enG4/+; PCNA-EmGFP/UAS ab⁵⁵*. **B)** Expresión de PCNA-EmGFP (verde). Obsérvese el aumento en el compartimento posterior. (Comparar con Figura 38C, página 74, donde se muestra la expresión salvaje de PCNA-EmGFP). **B')** Expresión de Abrupt (rojo). Nótese el aumento de expresión en el compartimento posterior. **B'')** Superposición de las

imágenes (B) y (B'). **C)** Disco de ala *sdG4/+; UAS GFP/+* mostrando la expresión de PH3 (rojo). **D)** Disco de ala *sdG4/+; UAS ab⁵⁵/+* mostrando la expresión de PH3 (rojo). **E)** Gráfica representando la fluorescencia por área de PH3 en la región del disco del “wing pouch” donde se sobre-expresa *abrupt* versus la expresión en el *notum* donde Abrupt se expresa de manera salvaje (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=15 discos para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μ m. n.s.: no significativo, * 0,01 < p < 0,05.

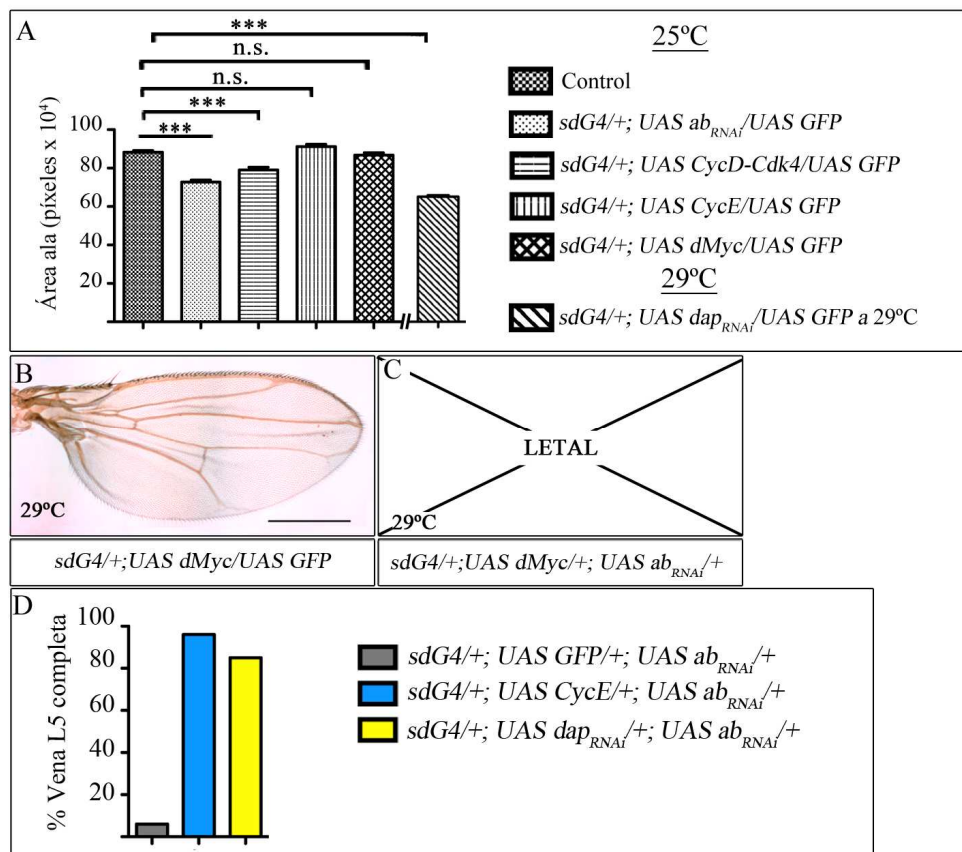


Figura A3. 3: Fenotipo de sobre-expresión de CycD-Cdk4, CycE, dMyc y de la inactivación de la función de *dacapo*.

A) Gráfica representando el tamaño de las áreas de las alas de los genotipos indicados. Nótese que a diferencia del resto, las alas del genotipo *sdG4/+; UAS dap_{RNAi}/UAS GFP* fueron crecidas a 29°C para comprobar la reducción que produce la inactivación de *dacapo* en comparación con el tamaño que presentan las alas salvajes (control). (n=20 alas para cada genotipo). **B)** Ala *sdG4/+; UAS dMyc/UAS GFP* desarrollada a 29°C que presenta defectos en el tamaño y en las venas. **C)** Las moscas *sdG4/+; UAS dMyc/+; UAS ab_{RNAi}/+* desarrolladas a 29°C son letales, por lo que no se pudo analizar el fenotipo de las alas. **D)** Gráfica representando el porcentaje de las alas que presentan la vena L5 completa *sdG4/+; UAS GFP/+; UAS ab_{RNAi}/+* (n=51 alas), *sdG4/+; UAS CycE/+; UAS ab_{RNAi}/+* (n=45 alas) y *sdG4/+; UAS dap_{RNAi}/+; UAS ab_{RNAi}/+* (n=20 alas). Las barras de calibración representan 500 μm. n.s.: no significativo, *** p<0,001.

APÉNDICE 4

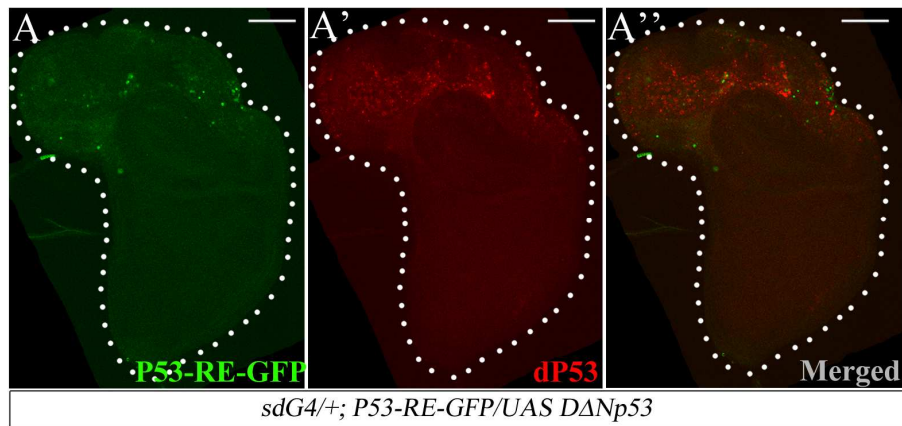


Figura A4. 1: Respuesta del elemento P53-RE-GFP a la sobre-expresión de la isoforma truncada de Dp53.

(A-A'') Disco de ala *sdG4/+; P53-RE-GFP/ UAS DΔp53*. **A)** Expresión GFP (verde). Nótese la expresión en la región del “wing pouch”. **A')** Expresión de DP53 (rojo). **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). Las barras de calibración representan 50 μm.

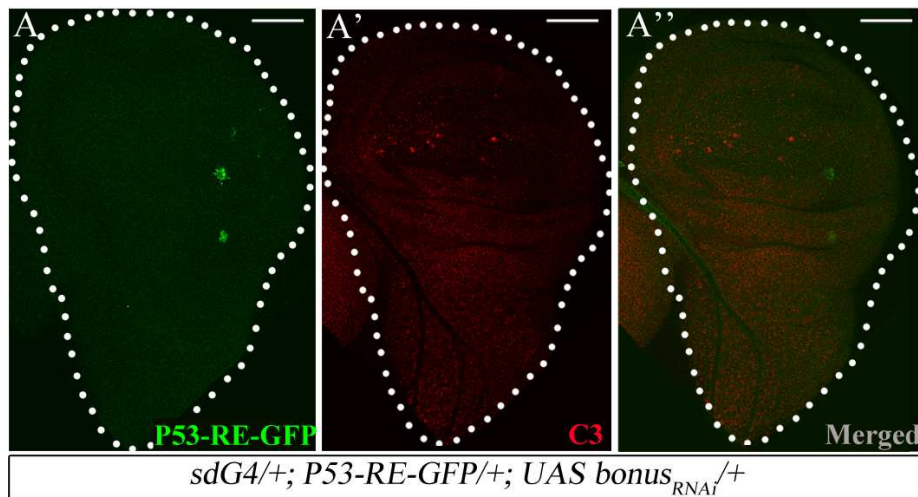


Figura A4. 2: Respuesta del elemento P53-RE-GFP a la inactivación de *bonus*.

(A-A'') Disco de ala *sdG4/+; P53-RE-GFP/+; UAS bonus_{RNAi}/+* **A)** Expresión de GFP (verde). **A')** Expresión de C3 (rojo). **A'')** Superposición de las imágenes (A) y (A'). Las barras de calibración representan 50 μm.

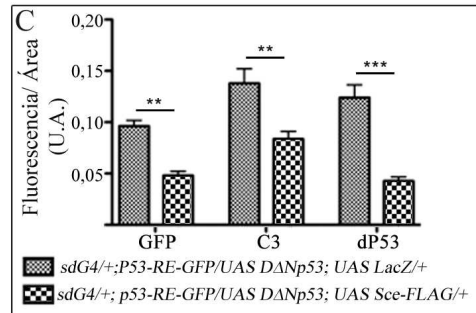
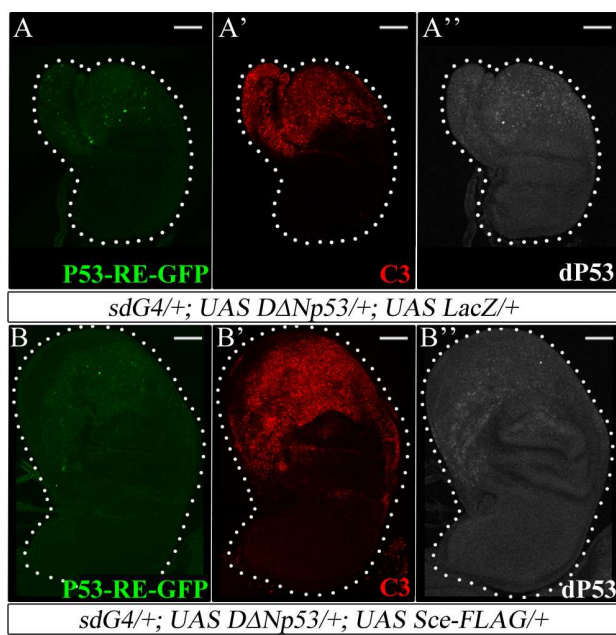


Figura A4. 3: Altos niveles de Sce inhiben la apoptosis inducida por la sobre-expresión de la isoforma truncada de Dp53.

(A-A'') Disco de ala *sdG4/+ UAS DΔp53/+; UAS LacZ/+*. **A**) Expresión GFP (verde). **A')** Expresión de C3 (rojo). **A'')** Expresión de DP53 (blanco). (**B-B'')** Disco de ala *sdG4/+ UAS DΔp53/+; UAS Sce-FLAG/+*. Nótese el aumento de tamaño respecto a (A-A'').

B) Expresión GFP (verde). **B')** Expresión de C3 (rojo). **B'')** Expresión de DP53 (blanco). **C)** Gráfica representando la cuantificación de fluorescencia por área de los niveles de C3 de los discos *sdG4/+ UAS DΔp53/+; UAS LacZ/+* versus *sdG4/+ UAS DΔp53/+; UAS Sce-FLAG/+*, (U.A.- Unidades Arbitrarias) (n=20 para cada genotipo). Las barras de calibración representan 50 μm. ** 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001.

ANEXO 2

ANEXO 2